Aus der Abteilung für Veterinärmedizin (Abteilungsvorsteher Priv.-Doz. Dr. R. Schindler)
des Bernhard Nocht-Instituts für Schiffs- und Tropenkrankheiten Hamburg
(Direktor: Prof. Dr. Dr. Vogel)
vorgelegt über
Das Institut für Parasitologie der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin (Direktor: Prof. Dr. J. Boch)

Versuche zur Immunisierung von Mäusen gegen eine Plasmodium berghei-Infektion und die Bedeutung komplementbindender Antikörper für die Immunität

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin

an der Freien Universität Berlin

1965

vorgelegt von

Dieter Friedrich Martin Mehlitz

Tierarzt aus Berlin

Journal-Nr. 503

Aus der Abteilung für Veterinärmedizin (Abteilungsvorsteher Priv.-Doz. Dr. R. Schindler)
des Bernhard Nocht-Instituts für Schiffs- und Tropenkrankheiten Hamburg
(Direktor: Prof. Dr. Dr. Vogel)
vorgelegt über
Das Institut für Parasitologie der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin (Direktor: Prof. Dr. J. Boch)

Versuche zur Immunisierung von Mäusen gegen eine Plasmodium berghei-Infektion und die Bedeutung komplementbindender Antikörper für die Immunität

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Dieter Friedrich Martin Mehlitz
Tierarzt aus Berlin

Journal-Nr. 503

Gedruckt mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. J. Boch

Referent: Prof. Dr. J. Boch

Korreferent: Prof. Dr. F. Schmidt-Hoensdorf

Tag der mündlichen Prüfung: 23. 7. 1965

I. Einleitung

II. A. Nachweis und Verhalten von Antikörpern bei der Plasmodieninfektion des Menschen und der Tiere

B. Aktive und passive Immunisierung mit lebenden oder abgetöteten Plasmodien beim Menschen und beim Tier

III. Eigene Untersuchungen

A. Material und Methoden

B. Ergebnisse

1. Versuche zur Immunisierung von Mäusen mit lebendem Plasmodium berghei unter dem Einfluß einer Milchdiät

2. Versuche zur Immunisierung von Mäusen mit Plasmodium berghei-Extrakt und Freundschem Adjuvans

3. Prüfung von Seren aus den Versuchen zur Immunisierung mit lebenden Plasmodien und mit Plasmodium berghei-Extrakt und Freundschem Adjuvans in Neutralisationstesten

IV. Besprechung der Ergebnisse

V. Zusammenfassung

VI. Literaturverzeichnis

VII. Lebenslauf

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546516_0067

I. Einleitung

Mäuse sind gegenüber einer Plasmodium berghei-Infektion hochempfänglich. Nur in seltenen Fällen konnten bei bestimmten Stämmen Spontanheilungen festgestellt werden (KRETSCHMAR 1962, RAMAKRISHNAN und Mitarb. 1965).

Durch eine Milchfütterung der Mäuse vor und während der akuten Phase der Infektion kann die Resistenz der Tiere gesteigert werden, so dass sie überleben und in der Regel Antikörper und eine Immunität ausbilden. Doch gibt es Ausnahmefälle, in denen Mäuse mit komplementbindenden Antikörpern der Infektion erliegen oder Tiere ohne Antikörper die Infektion überstehen (SCHINDLER und MEHLITZ 1965/1).

Daher ergibt sich die Frage, welche Bedeutung komplementbindenden Antikörpern für die Immunität gegen eine Plasmodium berghei-Infektion zukommt. Ich habe versucht, in einer Reihe von Untersuchungen einen Beitrag zur Klärung dieses für Theorie und Praxis gleich wichtigen Problems zu leisten.

Zu diesem Zweck habe ich NMRI-Mäuse unter dem Einfluss einer Milchdiät mit verschiedenen Mengen von Plasmodium berghei infiziert. Die Mortalität der Tiere nach dem Ende der Milchdiät diente als Mass für die Ausbildung einer Immunität. Die Antikörperreaktion wurde durch Stichprobenuntersuchungen bei einigen Mäusen geprüft.

Weiterhin wurde untersucht, ob nach Injektion von Extrakten aus Plasmodium berghei bei Mäusen serologisch nachweisbare Antikörper auftreten und ob die Tiere gleichzeitig eine Immunität erwerben.

Schliesslich habe ich Seren von infizierten und mit Plasmodienextrakten behandelten Mäusen in vitro auf neutralisierende Wirkung geprüft.

II.A. Nachweis und Verhalten von Antikörpern bei Plasmodieninfektionen des Menschen und der Tiere.

Bisher sind nur wenige Untersuchungen über den Nachweis von Antikörpern bei der Plasmodium berghei-Infektion der Nagetiere gemacht worden. Deshalb scheint es mir notwendig, die Literatur über Plasmodieninfektionen anderer Tiere und des Menschen zu berücksichtigen.

Die ersten Versuche zum Nachweis von Antikörpern gegen Plasmodieninfektionen beim Menschen mit der Komplementbindungsreaktion (KBR) unternahm DE BLASI (1907). Als Antigen benutzte er pulverisierte Erythrozyten von Patienten, die akut und chronisch an Malaria-tertiana erkrankt waren. FERRANNINI (1911) verwendete wässrige und alkoholische Extrakte aus der Milz von Malariapatienten als Antigen. Diese Untersuchungen hatten ein negatives Ergebnis.

Positive Resultate bekam erstmals GASBARRINI (1914) mit Seren von Malaria-tertiana- und Malaria-quartana-Patienten. Er gewann sein Antigen, indem er parasitierte Erythrozyten dreimal in phys. Kochsalzlösung wusch, in destilliertem Wasser hämolysierte, im Exsikkator trocknete, dann pulverisierte und schließlich mit NaCl-Lösung extrahierte. Trotz starken Befalls der Erythrozyten waren nicht alle auf diese Weise bereiteten Antigene brauchbar. Im allgemeinen erwiesen sie sich nur dann als aktiv, wenn das Ausgangsmaterial von schweren und chronisch verlaufenden Malariafällen stammte. THOMSON (1913, 1918, 1919) bemühte sich, das Antigen weiter zu verbessern. Er kultivierte Malariaparasiten in vitro nach einer modifizierten Methode

von BASS und JOHNS (1913) und erzielte mit seinen Antigenen einheitlichere Ergebnisse als die früheren Untersucher. 1927 beobachtete KINGSBURY das Auftreten von Kreuzreaktionen zwischen Plasmodium falciparum und Plasmodium vivax.

GOGGESHALL und EATON (1938) konnten mit der KBR auch bei Affen nach Infektion mit Plasmodium knowlesi Antikörper nachweisen. Die Titer lagen zwischen 1:2 und 1:8; nur bei Superinfektionen wurden Titer von 1:32 festgestellt. Die Angaben der Autoren lassen nicht erkennen, wann Antikörper erstmalig nachgewiesen wurden. Sie gaben lediglich an, daß bei einem Versuchstier am 21. Tage nach der Infektion der Titer 1:8 betrug und daß Antikörper sowohl während der akuten als auch in der chronischen Phase der Infektion nachzuweisen waren. Die Autoren fanden, daß die Antikörperbildung bei mit Plasmodium knowlesi infizierten Affen sehr unterschiedlich war. Bei einigen Affen ließen sich niedrige, bei anderen höhere Titer feststellen, obwohl die Infektionsdosis die gleiche war. Sie vermuteten, daß Affen mehr schützende als komplementbindende Antikörper bilden, da auch Tiere mit niedrigem KBR-Titer die Infektion überstanden. Nach ihrer Meinung gibt es also zwei Antikörpersysteme mit verschiedenem Wirkungsmechanismus. Daraus kann man folgern, daß die Höhe des KBR-Titers wenig über den Grad der erworbenen Immunität aussagt.

EATON und COGGESHALL (1939) beobachteten bei späteren Versuchen, daß der Titer einen Monat nach der akuten Erkrankung sein Maximum erreicht. Bis zum 4. Monat p.i. blieb er auf gleicher Höhe, erst dann gab es einen deutlichen Titerabfall. Aber auch wenn mikroskopisch keine Parasiten mehr nachzuweisen waren, reagierte das Serum in der KBR noch positiv.

Mit Antigenen aus Affenplasmodien wurden auch Versuche zum Nachweis von Antikörpern bei der menschlichen Malaria ge-

macht. Nach KLIGLER und YOELI (1941) ist die KBR beim Menschen mit einem Plasmodium knowlesi-Antigen drei Wochen p.i. positiv, nach REIN und Mitarb. (1949) bereits 6 bis 7 Tage p.i.. Auch mit einem Plasmodium gallinaceum-Antigen erhielten KLIGLER und YOELI (1941) positive Reaktionen. Es besteht also eine Kreuzreaktion zwischen Plasmodium knowlesi, Plasmodium gallinaceum und menschlichen Malariaparasiten. Die aus Plasmodien gewonnenen Antigene sind also nicht artspezifisch. Darauf haben auch NIYOGI (1942), DULANEY und MORRISON (1944), DULANEY und WATSON (1945), LIPPINCOTT und Mitarb. (1945) sowie MAYER und HEIDELBERGER (1956) hingewiesen.

In verschiedenen Untersuchungen kamen DULANEY und Mitarb. (1942) zu folgenden Resultaten: Bei experimentellen Infektionen mit Plasmodium vivax und Plasmodium falciparum erscheinen Antikörper kurz nach dem Auftreten der Parasiten im Blut. In den meisten Fällen sinkt der Titer nach Behandlung mit Chinin schnell. Bei der natürlich erworbenen Malaria waren die Ergebnisse ähnlich. Die Antikörper sind ebenfalls kurz nach dem Auftreten der Parasiten im Blut nachzuweisen, und die KBR wird nach der Behandlung der Patienten negativ. Von 125 getesteten Patienten mit positivem Blutbefund reagierten 81,6 % positiv in der KBR. Mikroskopische Blutuntersuchungen und KBR stimmten in 88 % der Fälle überein. Die KBR ist, so meinten die Autoren, sehr spezifisch, jedoch sei bei der Malariadiagnose der Blutausstrich als Hilfsmittel unentbehrlich.

1918 konnte PEWNY erstmals Antikörper mit der Präzipitationsreaktion bei der menschlichen Malaria nachweisen. Er mischte parasitierte Erythrozyten mit Aqua dest., liess sie einige Tage bei 20°C stehen, zentrifugierte den Überstand, verdünnte ihn mit NaCl-Lösung und benutzte ihn als Testantigen. Das Antigen unterschichtete er mit Serum von Patienten, die an einer Plasmodium vivax-Infektion erkrankt waren. Innerhalb von 20 Stunden entstand an der Berührungsstelle zwischen Antigen und Serum eine Trübung. TALIAFERRO

und Mitarb. (1927) und TALIAFERRO und TALIAFERRO (1928) setzten die Studien mit der Präzipitation (Ringtest) fort. Sie benutzten eine mit Plasmodium falciparum infizierte Placenta als Ausgangsmaterial für das Antigen. Auch sie stellten Kreuzreaktionen zwischen Plasmodium falciparum und Plasmodium vivax und Plasmodium falciparum-Serum fest. ROW (1931) erhielt mit Antigenen aus Plasmodium vivax- und Plasmodium falciparum-Kulturen positive Reaktionen. Bei 29 von 33 Patienten hatten DULANEY und HOUSE (1941) positive Präzipitationsreaktionen mit einem Plasmodium knowlesi-Antigen.
Die ersten Versuche zum Nachweis agglutinierender Antikörper gegen Plasmodien wurden bei Affen ausgeführt (EATON 1938). Als Antigen benutzte man Affenerythrozyten, die mit Plasmodium knowlesi befallen waren. Das Serum infizierter Affen wurde mit den parasitierten Erythrozyten gemischt; nach zweistündigem Stehen bei 20°C konnte man die agglutinierten, parasitierten Zellen mikro- und makroskopisch sehen. Spezifische Agglutinine erschienen 15 bis 45 Tage p. i.. Bei einigen chronischen Fällen wurden sie noch nach einem Jahr und länger nachgewiesen. Seren von akut kranken und von gesunden Affen agglutinierten die Malariaparasiten nicht.

STEIN und DESOWITZ (1963) versuchten, mit der Hämagglutinationsreaktion Antikörper bei der menschlichen Malaria nachzuweisen. Zum Unterschied zur Agglutination wird bei der Hämagglutination lösliches Antigen an mit Tannin vorbehandelte Erythrozyten adsorbiert. Es wurden Titer von 1:400 bis 1:25600 erzielt. Positive Reaktionen gab es allerdings auch bei Normalseren, aber mit bedeutend geringerem Titer. Die Autoren meinten, daß der Hämagglutinationstest die Schwierigkeit der Antigenbeschaffung beseitigt, da der Test schon auf kleinste Antigenmengen anspricht.

1961 stellten TOBIE und COATNEY mit Hilfe des indirekten Coonstestes im Serum von Patienten, die mit Plasmodium vivax infiziert waren, Antikörper fest. Blutserum eines chronisch Kranken wurde mit Fluorescinisothiocyanat gekuppelt. Plasmodium vivax enthaltendes Blut wurde auf einem Objektträger ausgestrichen, mit 0,1 %iger HCl fixiert und dann mit gekuppeltem Serum überschichtet. Die Parasiten färbten sich spezifisch an. INGRAM und Mitarb. (1961) fanden, daß auch natürlich mit Plasmodium cynomolgi (B Stamm) infizierte Affen genügend Antikörper für den direkten Coonstest produzieren. Mit Hilfe des direkten Coonstestes waren VOLLER und BRAY (1962), KUVIN und Mitarb. (1962/1) und COLLINS und Mitarb. (1964/1 u. 2) in der Lage, den Ablauf der Antikörperproduktion bei Plasmodium vivax-, Plasmodium falciparum- und Plasmodium malariae-Infektionen zu verfolgen. Nach KUVIN und Mitarb. (1962/1) traten kurz nach dem Erscheinen der Parasiten im peripheren Blut Antikörper auf und persistierten auch noch, wenn mikroskopisch keine Parasiten mehr nachzuweisen waren. Das Titermaximum bei einem Patienten lag bei 1:2560, bei einem anderen bei 1:320. Zwei Monate nach der Infektion begann der Titer langsam zu fallen. Am 121. Tage p.i. wurden noch Titer von 1:40 und 1:20 festgestellt. Genaue Untersuchungen über den Verlauf der Antikörperproduktion bei Plasmodium vivax- und Plasmodium cynomolgi (B Stamm) - Infektionen beim Menschen machten KUVIN und Mitarb. (1962/2). Sechs Tage nach dem Erscheinen der Parasiten im Blut wiesen sie Antikörper nach, der Titer stieg abrupt auf die Höhe von 1:5120. Weiterhin wurden erhöhte Gammaglobulinwerte bei allen Patienten beobachtet. Ihre Spitzenwerte deckten sich zeitlich mit dem Antikörpermaximum. TOBIE (1964) ist der Ansicht, daß das Ergebnis des Coonstestes mit dem Resultat der KBR nicht ganz übereinstimmt, da der Coonstest bedeutend empfindlicher reagiert. Mit beiden Testen sind zwar kurz nach dem Erscheinen der Parasiten im Blut Antikörper nachzuweisen, aber über die Dauer ihres Vorhandenseins kommt man mit beiden Methoden zu unterschiedlichen Ergebnissen.

VARGUES (1951) und VARGUES und Mitarb. (1951) wiesen zum erstenmal komplementbindende Antikörper bei Ratten im Verlauf einer Plasmodium berghei-Infektion nach. Das Antigen wurde aus Leberextrakten infizierter Tiere bereitet. Am 10. Tage p.i. konnten zuerst Antikörper nachgewiesen werden. Der Titer betrug anfangs 1:4 stieg bis zum 15. Tage p.i. auf 1:15 und blieb 2 Monate lang auf dieser Höhe. Fünf Monate p.i. konnte noch ein Titer von 1:5 festgestellt werden. Nach PAUTRIZEL und NGUYEN-VINH-NIEN (1953) erscheinen bei Ratten 12 Tage p.i. komplementbindende Antikörper und erreichen zwischen dem 15. und 30. Tage p.i. ihr Maximum. SCHINDLER und MEHLITZ (1965/1) fanden, daß Antikörper bei NMRI-Mäusen, die ausschließlich mit Milch ernährt wurden, früher als bei normal ernährten Mäusen festzustellen waren, nämlich bereits am 8. Tage p.i.. In den folgenden Tagen stieg der Titer schnell auf 1:320. Die Antikörper persistierten bei den Mäusen über lange Zeiträume. 533 Tage p.i. waren sie noch bei allen Tieren in z.T. hohen Konzentrationen nachweisbar; erst bei einer Untersuchung am 603. Tage p.i. war bei 2 von 24 Tieren die KBR negativ. Bei der Beurteilung der Titerpersistenz war zu berücksichtigen, daß die Mäuse 323 Tage nach der ersten Infektion reinfiziert worden waren. Die Infektionsdosis betrug bei einem Teil der Tiere nur einen Bruchteil einer LD_{50}. Nur in seltenen Fällen kam es danach zu einem Titeranstieg. Bei der Mehrzahl der mit $< 1\ LD_{50}$ infizierten Tiere dürfte daher ein Boostereffekt auszuschließen sein. Trotzdem ist auch bei diesen Tieren die KBR 603 Tage p.i. noch positiv. Nach Reinfektionen mit hohen Dosen (40 bis 400 LD_{50}) kam es regelmäßig zu einem langanhaltenden Titeranstieg. Dabei wurden höhere Antikörpertiter (bis 1:2560) als nach einer einmaligen Infektion erreicht.

DESOWITZ und STEIN (1962) und BRAY (1964) konnten mit der Hämagglutination bei immunen Ratten Titer bis 1:20480 erreichen. Diese Titer liegen damit wesentlich höher als die mit der KBR erhaltenen.

Fluoreszenzserologische Untersuchungen zum Nachweis von Antikörpern bei der Plasmodium berghei-Infektion machten BROOKE und Mitarb. (1959) und JACKSON (1960). Diese Autoren wiesen Antikörper mit dem direkten, TOBIE und COATNEY (1961), VOLLER (1962) sowie KREIER und RISTIC (1964) mit dem indirekten Coonstest nach. Letztere meinten, daß Antikörper bereits in vivo an die Parsiten gebunden werden.

Untersuchungen über präzipitierende und agglutinierende Antikörper bei der Plasmodium berghei-Infektion konnte ich in der Literatur nicht finden.

II. B. Aktive und passive Immunisierung mit lebenden oder abgetöteten Plasmodien beim Menschen und beim Tier.

Versuche zur aktiven Immunisierung gegen Plasmodieninfektionen, sei es mit lebenden oder mit abgetöteten Parasiten, haben sehr unterschiedliche Ergebnisse gehabt. Es wäre unmöglich, bei einem Überblick alle Arbeiten aus den letzten Jahrzehnten zu berücksichtigen. Anhand einiger wichtiger Veröffentlichungen soll über die gewonnenen Erkenntnisse berichtet werden.

SCHILLING (1939) gelang es, durch subcutane Injektion von wenigen Blutkörperchenparasiten eine Immunität zu erzielen. Aufsteigende Infektionsmengen haben ohne Fieberreaktion die Bildung von Abwehrkräften angeregt. Durch anschließende Inokulation von Sporozoiten wurde gegen diese eine Immunität erzeugt. BOYD und KITCHEN (1936) immunisierten gegen Plasmodium vivax. Sie inokulierten infektiöses Blut während einer Atebrin-Kur. Durch die Zerstörung der Parasiten sollte das Antigen frei werden und immunisieren. 24 Stunden nach der vollständigen Eliminierung des Medikaments aus dem Organismus wurde durch Mücken reinfiziert. Die Infektion ging an, verlief aber leichter als bei den Kontrollen.

Der größte Teil der experimentellen Arbeit über die Malariaimmunität konzentriert sich auf die erythrozytären Formen der Parasiten. Viele Beobachtungen sprechen dafür, daß die Immunität gegen die Trophozoiten gerichtet ist (TALIAFERRO 1949, BOYD und KITCHEN 1936, BOYD und Mitarb. 1936, SINTON 1940, RUSSEL und Mitarb. 1942 und MACDONALD 1957). Nach SINTON (1939) ist die Immunität nach einem schwachen antigenen Reiz gering oder bleibt ganz aus. Ist der Reiz stärker und von längerer Dauer, so wird ein höherer Immunitätsgrad erreicht. Eine starke, kurz dauernde Parasitämie ist wirksamer als eine schwache, lang anhaltende.

Etienne und Edmont SERGENT (1910) versuchten, Vögel aktiv gegen Plasmodium relictum zu immunisieren. Die Autoren bewahrten Plasmodium relictum-Sporozoiten bei 2° bis 23°C 12 bis 24 Stunden in vitro auf und injizierten diese 24 Kanarienvögeln; nur 7 dieser Tiere zeigten danach einen Schutzeffekt. Unterschiedliche Ergebnisse erzielten RUSSEL und Mitarb. (1941, 1942) und MULLIGAN und Mitarb. (1940, 1941) bei der Immunisierung von Geflügel. Es entwickelten sich hohe Agglutinationstiter (1:32000) nach einer Inokulation von inaktivierten Sporozoiten (Plasmodium gallinaceum). Die Tiere bekamen zwar eine Infektion nach dem Stich einer infizierten Mücke, jedoch war der Krankheitsverlauf weniger schwer als bei den Kontrolltieren und den Tieren mit niedrigerem Titer. Besser war der Schutz bei einer Kombination von inaktivierten Sporozoiten und Immunserum (RUSSEL und MOHAN 1942). SHORTT und MENON (1940) behandelten parasitenhaltiges Blut mit Saponin vor und immunisierten mit dem Extrakt Affen. Auch mit diesem Verfahren konnte keine nennenswerte Immunität erzielt werden.

THOMSON und Mitarb. (1945) und FREUND und Mitarb. (1948) gelang es, durch Injektion von abgetöteten Parasiten (Plasmodium knowlesi) und Freundschem Adjuvans eine Immunität bei Affen zu erzielen. Nach Injektion von Plasmodium knowlesi-Extrakt und Adjuvans konnten sie die Antikörperbildung

steigern. Affen wurden zweimal vacciniert und dann infiziert. Der Höhepunkt der Antikörpertiter war 6 bis 8 Wochen nach der ersten Vaccination. Affen, die unvorbehandelt fast immer einer Plasmodium knowlesi-Infektion erlagen, überlebten. Eine Abhängigkeit zwischen Immunität und Höhe des Serumtiters war bei den einzelnen Tieren nicht festzustellen. In den Arbeiten von FREUND und Mitarb. (1945) wurde ausgeführt, daß eine Immunisierung gegen Plasmodium lophurae und Plasmodium cathemerium gelingt. Es konnte ebenfalls durch Zugabe von Adjuvans zum Antigen die Antikörperproduktion gesteigert werden. Bei der Antigenbereitung wurden die parasitierten Erythrozyten in phys. Kochsalzlösung mit 0,1 %igem Formalinzusatz suspendiert und 12 Stunden bei 4°C aufbewahrt. Die Suspension wurde dann dreimal mit phys. Kochsalzlösung gewaschen und mit Freundschem Adjuvans gemischt. Vier Enten bekamen zwei Injektionen dieser Mischung einmal mit getötetem Mycobacterium tuberculosis (komplettes Adjuvans) und einmal ohne (inkomplettes Adjuvans) im Abstand von einem Monat. Vier Wochen nach der letzten Antigengabe erfolgte die Infektion mit einer massiven Parasitendosis i.v.. Während bei den Kontrollenten 54 % der Erythrozyten mit Parasiten befallen waren, waren es bei den immunisierten Tieren nur 7,6 %. Diese Enten überlebten im Gegensatz zu den Kontrollen die Infektion. Auch THOMSON und Mitarb. (1947) arbeiteten mit Plasmodium lophurae-und Plasmodium cathemerium-Antigenen in Kombination mit Freundschem Adjuvans. Nach Infektion mit Plasmodium lophurae starben die immunisierten Versuchstiere selten, und der Grad der Parasitämie war bei ihnen vermindert. Bei Plasmodium cathemerium-Infektionen wurden sehr unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Wiederholte Antigeninjektionen schützten 6 Monate, während nur eine Injektionsdosis auf verschiedene Applikationsorte verteilt eine schwächere Wirkung hatte. Nach der Applikation von Antigen ins subcutane Fettgewebe trat keine Schutzreaktion auf. HEIDELBERGER und Mitarb. (1946/1, 2, 3, 4) stellten aus einer konzentrierten Parasitenaufschwemmung (Plasmodium vivax) eine Vaccine her. Bei den mit diesem

Impfstoff behandelten Patienten war weder die Rückfallrate erniedrigt, noch konnte eine Immunität gegen eine natürliche Übertragung oder eine Blutinfektion nachgewiesen werden. Die negativen Ergebnisse wurden auf eine Schädigung der Antigene bei der Bereitung der Vaccine zurückgeführt.

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß bei Menschen, Affen und Vögeln nach einer auf verschiedene Weise durchgeführten Immunisierung mit unterschiedlichen Plasmodienspezies in gleicher Art Antikörper wie nach einer Infektion gebildet werden. Ob mit dem Auftreten der Antikörper die Ausbildung einer Immunität einhergeht, ist in vielen Fällen nicht sicher.

Eine aktive Immunisierung gegen Plasmodium berghei konnte in mehreren Versuchen nachgewiesen werden. VINCKE und VAN DEN BULCKE (1949) stellten fest, daß sich nach experimentellen Infektionen mit Plasmodium berghei bei Ratten, die den akuten Krankheitsverlauf überlebt hatten, eine Immunität gegenüber Reinfektionen entwickelt. Diese dauert nach RAFFAELE und BALDI (1950) mindestens 90 Tage. CORRADETTI (1950) infizierte Ratten 205 Tage nach der ersten Infektion, ohne daß die Tiere Krankheitserscheinungen zeigten. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen VARGUES und FABIANI (1951), FABIANI und VARGUES (1951) und FABIANI und Mitarb. (1952).

SERGENT (1954/1 u. 2), RAMAKRISHNAN und Mitarb. (1951) und FERNANDEZ NAFRIA (1958) behaupteten, daß die Tiere nach dem Abklingen der Infektion für eine Reinfektion wieder empfänglich werden. Die Resistenz führen sie auf eine latente Infektion des Wirtes zurück.

CORRADETTI (1952) und CORRADETTI und VEROLINI (1957) berichteten dagegen, daß die Immunität gegen Plasmodium berghei nicht an das Vorhandensein von Parasiten geknüpft ist. Werden die immunen Tiere entmilzt und anschließend reinfiziert,

so erkranken sie, und die Infektion nimmt einen chronischen Verlauf. Nach CORRADETTI (1959) bleibt die Immunität lebenslänglich bestehen. GARZA und BOX (1961) und KRETSCHMAR (1962, 1963) bestätigten diese Ansicht. KRETSCHMAR (1962) machte einen Übertragungsversuch mit Blut, Milz-, Leber- und Gehirnsuspensionen immuner Mäuse. In keinem Falle ging die Infektion an.

Die Frage, ob man die Immunität gegen Malaria passiv übertragen kann, wurde schon vor vielen Jahren untersucht. SOTIRIADES (1917) und KAUDERS (1927) konnten den Verlauf der Malaria durch Übertragung des Serums hochimmuner Patienten auf Kranke im akuten Fieberstadium günstig beeinflussen. NEUMANN (1933) und SCHILLING (1943) entnahmen wenige Stunden nach dem Anfall Serum und konnten nach dessen Injektion bei Patienten einen Schutzeffekt beobachten. BOYD und KITCHEN (1943) gelang es dagegen nicht, durch Transfusion von Blut hyperimmuner Menschen eine passive Immunität zu erzielen. COGGESHALL (1940) versuchte mit Affenimmunserum bei Menschen eine Immunität zu erzeugen. Serum, das vor oder während des akuten Krankheitsstadiums Affen entnommen wurde, erwies sich als nicht so wirksam wie das einige Zeit nach dem Anfall entnommene. Überzeugende Versuche, in denen die Schutzwirkung von Immunserum bei der Affenmalaria (Plasmodium knowlesi und Plasmodium inui) demonstriert wurde, gelangen COGGESHALL und KUMM (1937, 1938). Bei geringen Infektionsdosen war der Schutzeffekt des Immunserums deutlich, er nahm aber nach Superinfektionen ab.

In neueren Untersuchungen wurde von COHEN und Mitarb. (1961) der therapeutische Effekt von Immungammaglobulin bei Kindern studiert, die schwer mit Plasmodium falciparum infiziert waren. Das Gammaglobulinpräparat, das man von immunen Erwachsenen entnommen hatte, enthielt vorwiegend die 7S Komponente. Nach Behandlung kam es zu einer schnellen Besserung und zu einem Rückgang der Parasitämie. Vier Tage

nach Behandlungsbeginn hatte die Parasitämie weniger als 1 % des Ausgangswertes erreicht. Serum, dem man die 7S Komponente entzogen hatte, übte keinen Einfluß auf den Krankheitsverlauf aus. EDOZIEN und Mitarb. (1962) bestätigten diese Ergebnisse.

Aus diesen Versuchen ist zu schließen, daß es bei Plasmodieninfektionen eine passiv übertragbare Immunität gibt. Ob für diese Immunität die serologisch nachweisbaren Antikörper verantwortlich sind, bleibt offen.

Während bei der Plasmodium berhei-Infektion kein Zweifel an der guten Wirksamkeit einer aktiven Immunität besteht, sind die Resultate einer passiven Immunisierung nicht überzeugend.

FABIANI und FULCHIRON (1953) entnahmen Blut von gesunden, immunen und hyperimmunen Ratten und injizierten das gewonnene Serum 21 gesunden Ratten. Anschließend wurden die Tiere mit einer massiven Dosis stark parasitenhaltigen Blutes infiziert. Während bei allen Tieren, die mit Serum gesunder Ratten behandelt waren, kein Schutzeffekt festzustellen war, wurde bei den mit Immun- und Hyperimmunserum behandelten die Entwicklung einer starken Parasitämie verhindert und ihr Anstieg verzögert. Eine Seruminjektion verursachte nur einen Schutz für 1 bis 2 Tage, mehrere Seruminjektionen verzögerten die Parasitenentwicklung für 5 Tage. Der so erzielte Schutz reichte aber nicht aus, eine Infektion zu verhindern. Nach FABIANI und ORFILA (1956) hat Serum von Ratten im akuten Krankheitsstadium keinen Schutzeffekt, erst 10 Tage p.i. entnommenes bewirkte eine Verzögerung der Parasitämie. KRETSCHMAR (1962) konnte bei Mäusen keine passive Immunität erzeugen. Er injizierte 0,075 bis 0,25 ml Hyperimmunserum je Maus; ein Teil der Versuchstiere bekam eine einmalige Seruminjektion am Tage der Infektion, der andere Teil eine dreimalige Injektion, und zwar am Tage vor der Infektion, am Infektionstag und am 6. Tage p.i.. Die Über-

lebenszeiten dieser Tiere wichen nicht signifikant von denen der Kontrolltiere ab. TERRY (1956) und BRUCE-CHWATT und GIBSON (1956) konnten bei saugenden Jungratten immuner Mütter eine passive Immunität durch die Antikörper der Kolostralmilch feststellen. BRUCE-CHWATT und GIBSON (1956) und SERGUIEV und DEMINA (1957) fanden noch eine intrauterin erworbene passive Immunität, die aber weniger wirksam war. CAUSSE-VAILLES und Mitarb. (1961) wiesen nach, daß im Serum immuner Mäuse Schutzantikörper auftreten und diese an die β - und γ -Globuline gebunden sind. Sie fehlen in der α -Globulinfraktion. Im Verlaufe der Infektion steigen die Gammaglobuline an (BOX und GINGRICH 1958, BRIGGS und Mitarb. 1960).

Zusammenfassend ist festzustellen, daß bei Plasmodieninfektionen des Menschen und der Tiere mit verschiedenen serologischen Methoden Antikörper in z.T. hohen Konzentrationen nachgewiesen werden konnten. Die Plasmodium berghei-Infektion macht hierin keine Ausnahme. Während bei anderen Plasmodieninfektionen Spontanheilungen beobachtet werden, verenden Mäuse aber fast immer an den Folgen einer Plasmodium berghei-Infektion, wenn ihr Verlauf nicht durch eine Therapie oder eine Milchdiät beeinflußt wird. Diese Beobachtung läßt vermuten, daß die serologisch nachweisbaren Antikörper keinen entscheidenden Einfluß auf den Ablauf der Infektion haben.

Wenn humorale Antikörper bei der Abwehr einer Plasmodium berghei-Infektion nicht entscheidend sind, so ergibt sich die Frage, welche Faktoren die Immunitätsvorgänge beeinflussen. Nach NAUCK (1953) bilden zelluläre und humorale Faktoren und die natürliche Resistenz des Wirtes zusammen den Abwehrmechanismus bei Plasmodieninfektionen. TALIAFERRO und KLÜVER (1940) beobachteten, daß die Monozyten besonders auf dem Höhepunkt der Infektion und der folgenden Latenzperiode zunehmen. Außerdem kommt es zu einer Vermehrung der Zellen, die ihrem Typ nach zwischen Lymphozyten und

Monozyten stehen. GARNHAM und Mitarb. (1963) führten aus, daß die Hyperplasie des Lymphoid-Makrophagensystems die Basis der zellulären Immunität gegen Protozoeninfektionen ist. Trotz der zahlreichen Untersuchungen ist noch nicht entschieden, welche der genannten Faktoren die spezifische Phase der Abwehr bei Plasmodieninfektionen darstellt.

III. Eigene Untersuchungen

In meinen Versuchen wollte ich folgendes prüfen:

1. Geht mit dem Auftreten serologisch nachweisbarer Antikörper bei der Plasmodium berghei-Infektion die Ausbildung einer aktiven Immunität einher?
2. Neutralisieren komplementbindende Antikörper isolierte Plasmodien in vitro?

Zur Beantwortung dieser Fragen habe ich Mäuse infiziert und die Antikörperreaktion und die Ausbildung einer Immunität verfolgt. Außerdem wurden serologische Reaktion und Immunität nach einer Immunisierung mit Extrakten aus Plasmodium berghei untersucht. Schließlich habe ich Plasmodium berghei mit Saponin aus den Erythrozyten isoliert, sie zusammen mit Immunserum inkubiert und anschließend ihre Aktivität im Tierversuch geprüft.

A. Material und Methoden

Als Versuchstiere habe ich männliche und weibliche Mäuse mit dem Gewicht 17 bis 28 g des Stammes NMRI aus dem Zentralinstitut für Versuchstierzucht Hannover und der Zucht der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen verwendet. Vor und während der Versuche wurden sie zu je 4 bis 5 Tieren in Plexiglaskästen mit Sägemehleinstreu gehalten. Die Mäuse bekamen als Nahrung Standarddiät der Firma Latz und Wasser oder ausschließlich Milch ad libitum verabreicht.

Die Infektion erfolgte mit Plasmodium berghei (VINCKE und LIPS 1948). Der Stamm war ursprünglich mit Eperythrozoon coccoides verunreinigt, er wurde von KRETSCHMAR von Eperythrozoon gereinigt und dem Tropeninstitut zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden intraperitoneal infiziert. Parasitenhaltiges Blut wurde aus dem retrobulbären Venenplexus

entnommen. Zur Hemmung der Gerinnung habe ich dem Blut Heparin (0,1 ml auf 2,4 ml Blut) hinzugefügt. Von jeder verendeten Maus wurde ein Blutausstrich angefertigt, nach Giemsa gefärbt und mikroskopisch auf Plasmodien untersucht. Von lebenden, infizierten Tieren habe ich keine Blutausstriche gemacht, um sie durch Manipulationen nicht zu beunruhigen.

Da in früheren Untersuchungen (SCHINDLER und MEHLITZ 1965/2) festgestellt worden war, daß auch bei Infektionen mit Plasmodium berghei eine Abhängigkeit zwischen Dosis und Wirkung besteht, wurde in den einzelnen Versuchen die Stärke der Infektion gemessen. Zu diesem Zweck wurden gleichzeitig mit den Versuchstieren unbehandelte Kontrolltiere mit abgestuften Dosen infiziert und der dlm-Wert (dosis letalis media, berechnet nach SPEARMAN-KÄRBER) bei den Kontroll- und Versuchstieren bestimmt. In einigen Fällen wurde die dlm geschätzt. SCHINDLER und MEHLITZ 1965/1) benutzten in ihren Untersuchungen denselben Plasmodium berghei-Stamm wie ich in meinen Versuchen. Die Autoren ermittelten bei 7 Titrationen von Mäuseblut, das auf dem Höhepunkt der Parasitämie entnommen war, ein geometrisches Mittel von 2300 Ld_{50}. Diesen Wert habe ich den Schätzungen zugrunde gelegt.

In Vorversuchen (Tab. 1) habe ich verschiedene Verdünnungsmittel in Bezug auf die Verträglichkeit mit Plasmodium berghei geprüft. Von parasitenhaltigem Blut wurde eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 10 hergestellt und als Verdünnungsmittel 1. 0,85 %ige NaCl-Lösung, 2. 0,85 %ige NaCl-Lösung mit 20 % Kaninchenserum und 2 % Heparin und 3. Heparinblut von gesunden Mäusen getestet. Dabei erwies sich, daß Heparinblut und 0,85 %ige NaCl-Lösung mit 20 % Kaninchenserum und 2 % Heparin die Überlebensfähigkeit der Parasiten am besten erhält. Bei 0,85 %iger NaCl-Lösung allein war die Überlebensfähigkeit deutlich vermindert. Deshalb habe ich in den Hauptversuchen als Verdünnungsmittel 0,85 %ige NaCl-Lösung mit 20 % Kaninchenserum und 2 % Heparin verwendet.

Tab. 1 Einfluß des Verdünnungsmittels auf die Aktivität von Plasmodium berghei

		Verdünnungsmittel		
		0,85 %ige NaCl-Lösung	0,85%ige NaCl-Lösung +20% Kaninchenserum + 2% Heparin	Heparinblut von gesunden Mäusen *
Plasmodienverdünnung	Infektionsdosis	Mortalität		
10^{-1}	0,5 ml stark parasitenhaltigen Blutes	2/4**	4/4	4/4
10^{-2}		3/4	4/4	4/4
10^{-3}		4/4	4/4	4/4
10^{-4}		1/4	3/4	4/4
10^{-5}		0/4	4/4	4/4
10^{-6}		0/4	1/4	4/4

* 0,1 ml Heparin auf 2,4 ml Blut

** von 4 Mäusen starben 2 an den Folgen der Infektion

Die Immunseren stammten 1. von Mäusen, die ausschließlich mit Milch ernährt wurden und mit lebenden Plasmodien infiziert und zweimal reinfiziert worden waren und 2. von mit Plasmodienextrakten und Freundschem Adjuvans immunisierten Tieren. Ich habe Blut aus dem retrobulbären Venenplexus ohne Heparinzusatz entnommen und 10 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert. Das über dem Blutkuchen stehende Serum wurde abpipettiert und bei -15°C eingefroren und aufbewahrt. Unmittelbar vor der Durchführung der KBR bzw. der Neutralisationsteste wurden die Seren aufgetaut und bei 56°C 30 Minuten lang inaktiviert.

Zur Isolierung der Plasmodien und zur Herstellung des KBR-Antigens habe ich Blut auf dem Höhepunkt der Parasitämie mit Heparin entnommen. Bei 3000 UpM wurden die Erythrozyten abzentrifugiert, das Plasma entfernt und die Erythrozyten in phys. Kochsalzlösung gewaschen. Die Hämolyse erfolgte mit Saponin (Saponin, rein, weiss, Merck). Ein Teil Erythrozytensediment, ein Teil 0,85 %ige NaCl-Lösung und zwei Teile 0,3 %iges Saponin in phys. Kochsalzlösung wurden vermengt und bei 37°C 5 bis 8 Minuten im Wasserbad inkubiert. In der Regel waren dann alle Erythrozyten aufgelöst. Nach 30minutigem Zentrifugieren bei 3000 UpM wurde der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Das Sediment, die isolierten Plasmodien, habe ich durch mikroskopische Untersuchungen auf seinen Reinheitsgrad geprüft. Zur Herstellung des Antigens wurde das Sediment auf das Volumen der gepackten Erythrozyten aufgefüllt und bei -15°C 12 Stunden eingefroren. Durch weiteres zweimaliges Einfrieren und Auftauen sind die Plasmodien aufgeschlossen worden. Anschließend wurde bei 3000 UpM 30 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand war das Antigen. Die Aufbewahrung erfolgte bei -70°C.

Bei der Durchführung der KBR wurde das Vierfache vom Ambozeptor, vom Komplement das Eineinhalbfache der minimal wirksamen Dosis verwendet. Die Schaferythorzyten waren 4 %ig. Die Bindung erfolgte bei 4°C in 20 Stunden, die Lysis bei 37°C maximal 30 Minuten lang. Alle Reagenzien wurden im

Volumen 0,1 ml gemischt; als Verdünnungsflüssigkeit diente 0,85 %ige NaCl-Lösung.

Für die Versuche zur Immunisierung mit Plasmodium berghei-Extrakt und Freundschem Adjuvans wurden gleiche Teile des kompletten bzw. inkompletten Adjuvans und gleiche Teile des Plasmodium berghei-Antigens in der Konzentration von 1 : 5 (Verdünnungsflüssigkeit 0,85 %ige NaCl-Lösung) gemischt.

Bei der Ausführung der Neutralisationsteste habe ich die Parasiten in gleicher Weise isoliert wie für die KBR. Von den isolierten Plasmodien wurde eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 3,16 bzw. 10 hergestellt. Den einzelnen Verdünnungen wurden gleiche Volumina Immunserum mit den Titern 1:160 bis 1:1280 in der Verdünnung 1:10 hinzugefügt. Bei den Kontrollen habe ich statt des Immunserums Normalmäuseserum bzw. Kaninchenserum verwendet. Nach halbstündigem Inkubieren bei Zimmertemperatur erfolgte die Injektion von 0,5 ml des Serumparasitengemisches i.p. je Maus. Von den isolierten Plasmodien sowie von den Serumparasitengemischen der einzelnen Verdünnungen wurden vor und nach dem Inkubieren Ausstriche gemacht, nach Giemsa gefärbt und mikroskopisch untersucht. Ich habe geprüft, ob alle Erythrozyten vollständig hämolysiert waren und ob Unterschiede zwischen den einzelnen Parasitenverdünnungen mit positivem und negativem Serum festzustellen waren. Im dritten Neutralisationstest wurden den Serumparasitengemischen vor dem Inkubieren noch gleiche Teile aktives Meerschweinchenserum in der Verdünnung 1:10 hinzugefügt, um zu prüfen, ob es einen Einfluß auf eine neutralisierende Wirkung des Serums ausübt. Bei diesem Test wurden 0,75 ml der Suspension i.p. verabreicht. Eine Injektionsdosis enthielt also 0,25 ml Parasitenaufschwemmung, 0,25 ml positives bzw. negatives Serum und 0,25 ml Komplement (1:10).

B. Ergebnisse

Mäusen wurden lebendes Plasmodium berghei und Plasmodium berghei-Extrakt injiziert. Die Mortalität der Tiere nach der Infektion bzw. den Reinfektionen diente als Maß für die Ausbildung einer Immunität. Die Antikörperreaktion wurde durch Stichprobenuntersuchungen bei einigen Mäusen geprüft. Seren infizierter und mit Plasmodienextrakten behandelter Tiere habe ich in vitro auf neutralisierende Wirkung untersucht.

1. Versuche zur Immunisierung mit lebendem Plasmodium berghei unter dem Einfluß einer Milchdiät.

In diesen Versuchen wollte ich die Antikörperbildung und die Ausbildung einer Immunität nach einer Infektion mit Plasmodium berghei prüfen.

Mit Standarddiät ernährte Mäuse verenden nach einer Infektion mit minimalen Infektionsdosen, bevor sie eine Immunität oder höhere Konzentrationen von komplementbindenden Antikörpern bilden können. Mäuse, die weniger als die minimale Infektionsdosis erhalten, bekommen weder eine Immunität noch Antikörper (SCHINDLER und MEHLITZ 1965/1). Ich habe deshalb versucht, die Resistenz der Tiere durch eine Milchfütterung zu steigern, wie es SCHINDLER und MEHLITZ (1965/1) mit Erfolg getan haben.

Die Blutentnahmen für die Gewinnung von Serum für die KBR habe ich nur auf wenige Tiere beschränkt, da nach den Versuchen von KRETSCHMAR (1962) angenommen werden muß, daß die Mortalität von Mäusen nach einer Plasmodium berghei-Infektion durch häufige Beunruhigung der Tiere gesteigert wird. Es wurde nur wenig Blut entnommen, um nicht die Resistenz der Tiere durch einen zu hohen Blutverlust zu schwächen. Die von jeder Maus gewonnene Serummenge reichte für eine serologische Untersuchung in verschiedenen Verdünnungen

Tab. 2 Verlauf der Mortalität von mit Plasmodium berghei infizierten bzw. reinfizierten Mäusen (Versuch 1 und 3)

	Anzahl der infizierten Mäuse	Dauer der Milchfütterung	Infektionsdosis in dlm	Mortalität am 50.Tag p.i.	1.Reinfektion, Dosis in dlm am 50.Tag p.i.	Mortalität am 91.Tag p.i.	2.Reinfektion, Dosis in dlm am 91.Tag p.i.	Mortalität am 125.Tag p.i.
Versuch 1	195	vom 5.Tag vor bis zum 30.Tag nach und vom 36.Tag nach bis zum 125.Tag nach der Infektion	2300 (geschätzt)	150/195 (76,9%)	2300 (geschätzt)	164/195 (84,1%)	2300 (geschätzt)	171/195 (87,7%)
Versuch 3	80	vom 5.Tag vor bis zum 54.Tag nach der Infektion	8,4	51/80 (63,7%)	-	66/80 (82,4%)	-	66/80 (82,4%)

icht aus. Deshalb habe ich Blutproben von jeweils 4 bis
Tieren gemischt und das Serum der Mischung untersucht.

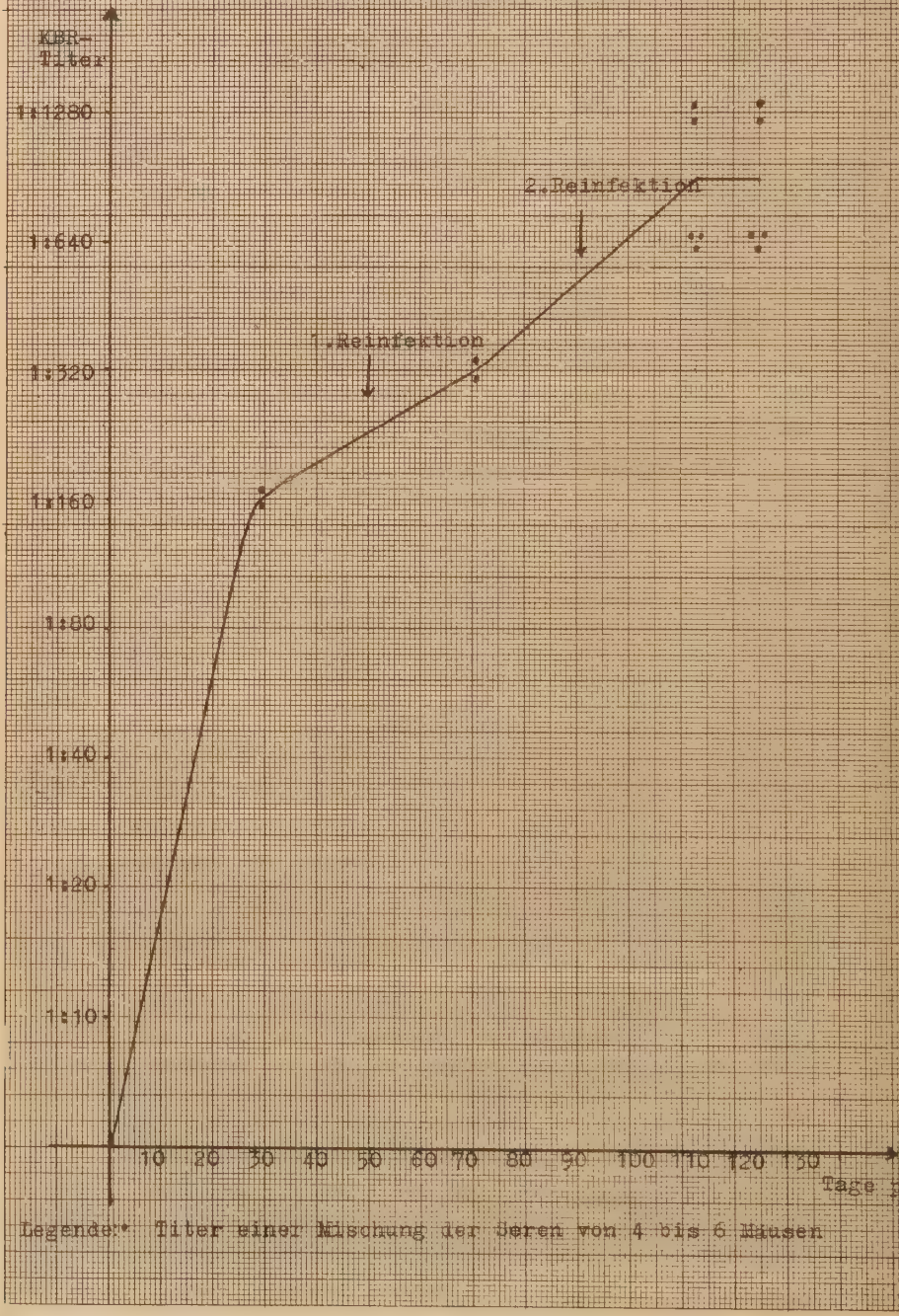
nsgesamt wurden 3 Versuche (1, 2 und 3), die sich in
ezug auf die Infektionsdosis unterschieden, durchgeführt.

m Versuch 1 wurden 195 weibliche Mäuse mit dem Gewicht
on 17 bis 19 g mit ≈2300 dlm infiziert und vom 5. Tage
or der Infektion bis zum 30. Tage nach der Infektion aus-
chließlich mit Milch ernährt. Bis zum Ende der Milchfütte-
ung starben 47 von 195 Tieren (24,1%). Nach dem Übergang
ur Standarddiät nahm die Sterblichkeit stark zu. Vom 30.
age bis zum 36. Tage p.i. starben weitere 43 Mäuse (22,1%).
eshalb habe ich am 36. Tage p.i. die Milchfütterung wieder
ufgenommen und sie bis zum 125. Tage p.i. fortgesetzt. Bis
um 50. Tage nach der Infektion waren trotz Verlängerung
er Milchfütterung 150 von 195 (76,9%) Tieren verendet. Die
is zu diesem Tag überlebenden Tiere wurden mit ≈2300 dlm
lasmodium berghei reinfiziert. Nach dieser Reinfektion
tarben bis zum 91. Tage p.i. 14 von 45 Mäusen (31,1%). Am
1. Tage p.i. erfolgte eine 2. Reinfektion mit gleicher Do-
is wie bei der ersten. Nach dieser Reinfektion starben bis
um 125. Tage p.i. weitere 7 Tiere (siehe auch Tab. 2). Bei
llen verendeten Mäusen konnten Plasmodien im Blut in großer
ahl nachgewiesen werden.

ie Antikörperbildung wurde bei den Tieren dieses Versuches
m 29., 71., 113. und 125. Tage p.i. überprüft. Die Blut-
ntersuchungen habe ich am 29. Tage und am 71. Tage p.i.
uf 12 Tiere beschränkt. Am 29. Tage p.i. wurde bei 2 Grup-
en von je 6 Mäusen Blut entnommen und das gemischte Serum
it der KBR untersucht. Beide Serummischungen hatten einen
iter von 1:160.

echs der 12 am 29. Tage p.i. untersuchten Mäuse waren bis
um 71. Tage p.i., das war der 21. Tag nach der 1. Rein-
ektion, verendet. Die überlebenden 6 Tiere und 6 weitere
urden zu diesem Zeitpunkt wieder mit der KBR auf Antikör-

Abb. 1. KBR-Titer in Mäusen nach Infektion und Reinfektionen mit ≈2300 d/m Plasmodium berghei (Versuch



Legende: * Titer einer Mischung der Seren von 4 bis 6 Mäusen

SELECTA A4 210 x 297 mm

per untersucht. Die Serumproben beider Gruppen hatten einen Titer von 1:320. Die 2. Reinfektion erfolgte, wie schon erwähnt, am 91. Tage p.i. 22 Tage später, also am 113. Tage p.i., lebten noch 26 Mäuse. Das gemischte Serum von je 5 bzw. 6 Tieren wurde auf komplementbindende Antikörper untersucht. Dabei ergab das Mischserum von 3 Gruppen den Titer von je 1:640 und von 2 Gruppen von je 1:1280 (siehe Abb. 1). Am 125. Tage p.i. habe ich das Serum von allen 24 noch lebenden Mäusen in ähnlicher Weise untersucht und das gleiche Ergebnis erhalten. Alle 24 Mäuse wurden am 125. Tage p.i. entblutet und das Serum für die Neutralisationsteste eingefroren.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die Mortalität der mit Plasmodium berghei infizierten Mäuse sehr hoch war. Bis zur Reinfektion am 50. Tage p.i. betrug sie 76,9%. Stichproben ergaben, daß von den Tieren komplementbindende Antikörper gebildet wurden. Der Titer betrug am 29. Tage p.i. 1:160. In einem früheren Versuch hatten SCHINDLER und MEHLITZ (1965/1) am 30. Tage p.i. einen Titer von 1:320 festgestellt. Die Mortalität betrug in diesem Versuch bis zum 50. Tage p.i. 30,9 %. Obwohl der Titer am 29. Tage p.i. in meinem Versuch nur um den Faktor 2 geringer war als bei SCHINDLER und MEHLITZ (1965/1), ist die Mortalität wesentlich höher.

Ich habe deshalb den Versuch noch zweimal wiederholt. Bei der ersten Wiederholung (Versuch 2) wurden 107 weibliche Mäuse mit einem Gewicht von 21 bis 23 g infiziert. Um zu prüfen, ob die große Mortalität im ersten Versuch von der hohen Infektionsdosis abhängt, habe ich in diesem Versuch eine geringere Dosis gewählt. 0,05 ml unverdünntes, stark parasitenhaltiges Blut hat $\approx$ 2300 dlm; ich habe es im Verhältnis 1:10 verdünnt, um ca. 200 dlm als Infektionsdosis zu erhalten. Die genaue Infektionsdosis wurde durch eine Titration des Inokulums gemessen. 0,05 ml der Plasmodienverdünnungen 10^{-1} bis 10^{-5} wurden je 5 Kontrolltieren injiziert. Dabei ergab sich, daß die Infektionsdosis im Versuch 2 257 dlm betrug.

107 Tiere erhielten vom 5. Tage vor der Infektion bis zum 38. Tage p.i. ausschließlich Milch als Nahrung.

Die Mortalität war in diesem Versuch noch höher als in meinem ersten. Bereits am 30. Tage p.i. betrug sie 74,4% und am 38. Tage p.i. 78,5 %. Da zu diesem Zeitpunkt die Sterblichkeit der Mäuse bereits höher war als im Versuch 1 am 125. Tage p.i., wurde dieser Versuch am 38. Tage p.i. abgebrochen.

Am 36. Tage p.i. habe ich von 5 Mäusegruppen zu je 5 Tieren Blut entnommen und das gemischte Serum jeder Gruppe auf komplementbindende Antikörper untersucht. Der Titer betrug zweimal 1:160, zweimal 1:320 und einmal 1:640.

Auch in diesem Versuch war es also zu einer Antikörperreaktion gekommen; trotzdem war die überwiegende Mehrzahl der Tiere verendet.

Im 3. Versuch habe ich auf die serologische Blutuntersuchung der Mäuse verzichtet. Es wurde die Auswirkung einer noch geringeren Infektionsdosis als im Versuch 2 geprüft.

80 weibliche Mäuse mit einem Gewicht von 21 bis 23 g habe ich mit 0,05 ml stark parasitenhaltigen Blutes, das 1:100 verdünnt worden war, infiziert. Die genaue Stärke der Infektion habe ich wieder, wie im Versuch 2, durch eine Titration des Inokulums festgestellt. Die Infektionsdosis betrug 8,4 dlm. Die Milchfütterung erfolgte vom 5. Tage vor bis zum 54. Tage nach der Infektion.

Bis zum 50. Tage p.i. starben 51 von 80 (63,7%), bis zum 91. Tage p.i. 66 von 80 (82,4%) der Tiere an den Folgen der Infektion (siehe auch Tab. 2).

Faßt man die Ergebnisse der Versuche 1, 2 und 3 zusammen, so ist folgendes zu sagen: KBR-Antikörper werden in den Versuchen 1 und 2 am 29. bzw. am 36. Tage p.i. in hoher

Konzentration nachgewiesen. Daraus kann man schließen, daß die Tiere einem antigenen Reiz ausgesetzt waren; es ist zu vermuten, daß auch die Mehrzahl der übrigen Tiere zu diesem Zeitpunkt komplementbindende Antikörper besaß. Trotzdem starb nach dieser Zeit der größte Teil der bis dahin überlebenden Tiere. Eine Immunität hat sich offensichtlich bei der Mehrzahl der Tiere nicht ausgebildet.

2. Versuche zur Immunisierung mit Plasmodium berghei-Extrakt und Freundschem Adjuvans.

In 2 Versuchen sollte geprüft werden, ob bei Mäusen durch Injektion von Extrakten aus Plasmodium berghei die Bildung komplementbindender Antikörper ausgelöst werden kann und ob gleichzeitig damit ein Schutz gegen Infektionen verbunden ist.

Versuch I.

184 männliche Mäuse mit einem Durchschnittsgewicht von 22 g wurden in 3 Gruppen (A, B und C) eingeteilt. Die Tiere der Gruppe A erhielten während des Versuches Standarddiät, die der Gruppe B 5 Tage vor Beginn der Immunisierung bis zum 10. Tage nach der Infektion (55 Tage lang) eine Milchdiät. Die Milchfütterung erfolgte deshalb, da ich untersuchen wollte, ob diese einen Einfluß auf die Antikörperbildung bzw. Immunität ausübt. Die Mäuse der Gruppe C dienten als Kontrollen, sie bekamen Standarddiät und wurden nicht behandelt.

Den Tieren der Gruppen A und B wurden in die Muskulatur jedes Hinterbeines 0,025 ml KBR-Antigen aus Plasmodium berghei, mit komplettem Adjuvans gemischt, injiziert. Am 22. Tage nach der ersten Immunisierung erfolgte eine zweite Injektion des Antigens mit inkomplettem Adjuvans. Während der Immunisierung wurde fortlaufend von jeweils 10 Tieren jeder Gruppe im Abstand von 4 bis 5 Tagen Blut entnommen und das gemischte Serum von jeweils 5 Tieren mit der KBR

Tab. 3 Verlauf der Infektion und Reinfektion der mit Plasmodium berghei-Extrakt und Freundschem Adjuvans immunisierten Mäuse (Versuch I)

	Infektionsdosis in dlm	KBR-Titer	Mortalität	Morbidität *	geometrisches Mittel der Überlebenszeit in Tagen (Minimum-Maximum)	Reinfektion Dosis in dlm am 73. Tag p.i.	Mortalität	Morbidität	geometrisches Mittel der Überlebenszeit in Tagen (Minimum-Maximum)
Gruppe A(64 Mäuse), immunisierte Tiere, mit Standarddiät ernährt	315,5	1:10 bis 1:20	6/6	6/6	21,3 (10-35)	2300 (geschätzt)	-	-	-
	31,5		9/11	10/11	19,3 (9-37)		1/2	2/2	10,0
	3,15		5/12	7/12	24,4 (13-45)		6/6	6/6	14,6 (10-26)
	0,315		1/12	1/12	19,0		10/11	11/11	17,8 (7-32)
	0,0315		2/12	2/12	18,0 (17-19)		10/10	10/10	18,0 (5-24)
	0,00315		0/11	0/11	-		11/11	11/11	19,2 (10-26)
			dlm= $10^{-3,2}$						
Gruppe B(55 Mäuse), immunisierte Tiere, mit Milchdiät ernährt	315,5	1:10 bis 1:20	5/5	5/5	15,8 (14-18)	2300 (geschätzt)	-	-	-
	31,5		9/9	9/9	20,4 (14-27)		-	-	-
	3,15		8/12	12/12	22,4 (15-34)		4/4	4/4	19,3 (10-25)
	0,315		5/9	5/9	32,6 (18-37)		2/4	4/4	21,0 (10-32)
	0,0315		0/11	0/11	-		11/11	11/11	13,6 (5-22)
	0,00315		0/9	0/9	-		9/9	9/9	16,6 (7-25)
			dlm= $10^{-3,7}$						
Gruppe C(65 Mäuse), Kontrolltiere, nicht immunisiert, mit Standarddiät ernährt	31,5		6/6	6/6	27,6 (10-32)	2300 (geschätzt)	-	-	-
	3,15		3/6	3/6	39,3 (38-42)		3/3	3/3	16,6 (10-20)
	0,315		2/6	2/6	19,0 (11-27)		4/4	4/4	23,0 (22-24)
	0,0315		1/12	1/12	17,0		11/11	11/11	21,5 (18-24)
	0,00315		1/12	1/12	42,0		11/11	11/11	19,4 (6-25)
	0,000315		0/12	0/12	-		12/12	12/12	25,8 (14-52)
	0,0000315		0/11	0/11	-		11/11	11/11	25,5 (17-35)
			dlm= $10^{-3,5}$						

* Die Mäuse wurden als krank angesehen, wenn sie anämisch waren und ein rauhes Fell hatten.

auf Antikörper untersucht. Auf diese Weise gelangte das Serum von allen Mäusen während der Immunisierung mindestens einmal zur Untersuchung. Die KBR war unmittelbar vor Beginn der Immunisierung negativ. Am 9. Tage nach der ersten Immunisierung betrug der Titer bei den Tieren der Gruppen A und B 1:5. Erst am 28. Tag, also 6 Tage nach der zweiten Antigeninjektion, stiegen die Titer auf 1:10 und 1:20 und blieben bis zur Infektion auf dieser Höhe. Die Kontrolltiere reagierten in der KBR immer negativ.

Am 40. Tage nach Beginn der Immunisierung wurden 64 Mäuse der Gruppe A, 55 der Gruppe B und 65 der Gruppe C mit Plasmodium berghei in abgestuften Dosen infiziert und zwar in der Art, daß jeweils Einheiten von 6 bis 12 Mäusen mit 315,5 bis 0,00315 dlm (Gruppe A und B) bzw. 31,5 bis 0,0000315 dlm (Gruppe C) infiziert wurden (siehe Tab. 3). Der dlm-Wert bei den Mäusen der Kontrollgruppe C lag bei $10^{-3,5}$, der der immunisierten Tiere der Gruppe A bei $10^{-3,2}$ und der der Gruppe B bei $10^{-3,7}$. Alle Kontrollmäuse, die erkrankten, starben auch an den Folgen der Infektion. Bei der Gruppe A überlebten 3 Tiere, die Krankheitserscheinungen gezeigt hatten, die Infektion, bei der Gruppe B 4 Tiere. Die Überlebenszeit der immunisierten Mäuse ist gegenüber der der Kontrolltiere nicht verlängert.

Alle überlebenden Mäuse wurden am 73. Tage p.i. mit $\approx$ 2300 dlm reinfiziert. Bis auf 2 Tiere der Gruppe A und 2 Tiere der Gruppe B verendeten alle zwischen dem 5. und 52. Tage nach der Reinfektion.

Nach zweimaliger Injektion von jeweils 0,05 ml Antigen und Freundschem Adjuvans war also die Antikörperproduktion gering, und die Mäuse wurden nicht immun. Deshalb habe ich weitere Mäuse in einem zweiten Versuch (Versuch II) nach einem modifizierten Immunisierungsplan von GELL und COOMBS (1963) behandelt. Durch neunmalige Antigeninjektion wollte ich versuchen, die Antikörperproduktion zu steigern und

die Mäuse auf diese Weise gegen eine Plasmodium berghei-Infektion zu immunisieren.

Es wurden die Versuchsgruppe A_1 und die Kontrollgruppe B_1 zu je 110 männlichen Mäusen mit einem Durchschnittsgewicht von 28 g gebildet. Die Tiere bekamen als Nahrung Standarddiät. Da im Versuch I die Mäuse, die während der Immunisierungsphase eine Milchdiät verabreicht bekamen, sich in bezug auf die Antikörperbildung und die Ausbildung einer Immunität nicht von den mit Standarddiät ernährten Tieren unterschieden, habe ich in diesem Versuch keine Mäuse mit Milch gefüttert.

Die Tiere der Gruppe A_1 bekamen 0,2 ml KBR-Antigen aus Plasmodium berghei, mit komplettem Adjuvans gemischt, subcutan injiziert. Die 2. Immunisierung erfolgte am 15. Tage nach der ersten mit inkomplettem Adjuvans in gleicher Weise. Am 21. Tage wurden 0,1 ml, am 22., 24., 26., 29., 31. und 33. Tage je 0,05 ml Antigen i.p. injiziert. 8 von 110 Mäusen starben während der Immunisierung intercurrent. Der Tod ist auf Bißwunden zurückzuführen, nicht aber auf die Applikation von Antigen oder Adjuvans. Letztere wurden gut vertragen, nur wenige Tiere hatten nach der zweiten Adjuvansgabe linsengroße Knoten am Applikationsort. Weitere 28 immunisierte- und Kontrollmäuse hatten Bißwunden. Diese Tiere wurden aus dem Versuch herausgenommen.

Am 36. Tage nach Beginn der Immunisierung wurden von allen Mäusen der Gruppe A_1 und der Kontrollgruppe B_1 Blut entnommen und das gemischte Serum von jeweils 5 Mäusen in der KBR auf Antikörper untersucht. Dabei konnte ich feststellen, daß je eine Serumprobe den Titer 1:40, 1:320 und 1:640 hatte. 8 Serumproben hatten den Titer 1:80 und 11 1:160. Die Kontrolltiere reagierten in der KBR negativ. Die von den immunisierten Mäusen gewonnenen Seren wurden für die Neutralisationsteste eingefroren.

b. 4 Verlauf der Infektion der mit Plasmodium berghei-Extrakt und Freundschem Adjuvans immunisierten Mäuse (Versuch II)

	Infektionsdosis in dlm	KBR-Titer	Mortalität	Morbidität	geometrisches Mittel der Überlebenszeit in Tagen (Minimum - Maximum)
Gruppe A_1 (90 Mäuse), immunisierte Tiere	241,0	1:40 bis 1:160	35/35	35/35	13,1 (5 - 27)
	24,1		25/25	25/25	12,4 (6 - 31)
	2,41		13/20	15/20	18,4 (10 - 33)
	0,241		1 /10	1/10	25,0
			dlm= $10^{-3,2}$		
Gruppe B_1 (94 Mäuse) Kontrolltiere, nicht immunisiert	241,0	—	35/35	35/35	13,2 (6 - 26)
	24,1		25/25	25/25	11,9 (8 - 28)
	2,41		17/25	18/25	18,5 (11 - 36)
	0,241		2/9	2/9	22,0 (13 - 31)
			dlm= $10^{-3,4}$		

Am 39. Tage nach dem Immunisierungsbeginn erfolgte die Infektion von 90 immunisierten- und 94 Kontrolltieren mit 241 bis 0,241 dlm (siehe Tab. 4).

Trotz des Vorhandenseins von Antikörpern mit den Titern von 1:40 bis 1:640 bei den immunisierten Tieren weicht die Mortalität dieser Mäuse (Gruppe A_1) nicht signifikant von der der Kontrolltiere (Gruppe B_1) ab.

Vergleicht man zusammenfassend die dlm-Werte in den Tabellen 3 und 4, so wird deutlich, daß ein Immunisierungseffekt in den Versuchen I und II nicht vorliegt. Ein Signifikanztest für die dlm-Titerdifferenzen bei 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit läßt sich nach LORENZ (1964) durchführen. Für den Versuch I gilt: Die Streuung sm des Titerlogarithmus der Kontrollgruppe C $10^{-3,5}$ beträgt : $sm_C = \pm 0,27$ (berechnet nach der Formel

$$sm = \frac{d}{100} \cdot \sqrt{S \frac{P_i (100-P_i)}{n_i - 1}} \cdot$$

Die Differenz von $/m_C - m_A/ = 3,5 - 3,2 = 0,3$. Der Unterschied der Schätzwerte zweier Logarithmen ist aber erst dann nicht mehr zufallsbedingt, wenn er größer ist als $1,96 \cdot \sqrt{2} \cdot s = 0,65$.

Da aber $/m_C - m_A/ < 1,96 \cdot \sqrt{2} \cdot s$ ist, kann nicht von einem Immunisierungseffekt gesprochen werden. Der beobachtete Unterschied kann auch mit der Annahme verträglich sein, daß die (wahren) Titer beide Male gleich sind und die beobachteten Schätzwerte lediglich Zufallsabweichungen zeigen.

Analog zu diesem Beispiel kann man für den Versuch I folgern:

$$/m_C - m_B/ = 3,5 - 3,7 = 0,2$$

$$1,96 \cdot \sqrt{2} \cdot s = 0,65$$

$$/m_C - m_B/ < 1,96 \cdot \sqrt{2} \cdot s$$

Für den Versuch II gilt:

$$sm_{B_1} = \pm 0,17$$

$$/m_{B_1} - m_{A_1}/ = 3,4 - 3,2 = 0,2$$

$$1{,}96 \cdot \sqrt{2} \cdot s = 0{,}47$$

$$/m_{B_1} - m_{A_1}/ < 1{,}96 \cdot \sqrt{2} \cdot s$$

3. Prüfung von Seren aus den Versuchen zur Immunisierung mit lebenden Plasmodien und mit Plasmodium berghei-Extrakt und Freundschem Adjuvans in Neutralisationstesten.

n den beiden Immunisierungsversuchen mit Plasmodienextrakten und Freundschem Adjuvans konnte trotz der Bildung von omplementbindenden Antikörpern mit Titern von 1:40 bis :640 keine Immunität beobachtet werden. Um die Bedeutung ieser Antikörper und der, die bei der Infektion mit lebendem Plasmodium berghei entstehen, zu untersuchen, habe ich ie auf ihre neutralisierende Wirkung in vitro geprüft. OLTYS (1957) gelang es, neutralisierende Antikörper bei rypanosoma brucei-Infektionen festzustellen. In Neutralisationsreaktionen inkubierte er verschiedene Serumverdünnungen mit lebenden Trypanosomen und prüfte ihre Infektiosität in Tierversuchen. Ich habe mich an die Technik von OLTYS angelehnt. Dabei bin ich von folgender Überlegung usgegangen: Wenn man die Antikörperwirkung eines Serums egenüber einem Parasit prüfen will, dann müssen beide miteinander in Kontakt gebracht werden. Nach Untersuchungen von ULTON und FLEWETT (1956) liegen die Plasmodien innerhalb on Erythrozyten, sie sind also gegen die Wirkung von Anikörpern geschützt. Durch eine Isolierung der Plasmodien erden diese von ihrer schützenden Erythrozytenmembran beeit und liegen frei.

n Vorversuchen wurde die Aktivität der mit Saponin isoierten Plasmodien geprüft. Dabei stellte sich heraus, daß ur einmal mit 0,85 %iger NaCl-Lösung gewaschene, isolier Plasmodien bei intraperitonealer Applikation toxisch irken. 7 von 8 Mäusen verendeten am 2. Tage p.i., ohne daß rasiten im peripheren Blut nachzuweisen waren. Einmal geschene Saponinextrakte aus normalen Mäuseerythrozyten hat-

ten die gleiche toxische Wirkung. Wurden die isolierten Plasmodien dreimal mit 0,85 %iger NaCl-Lösung gewaschen, so traten bei den Mäusen keine toxischen Erscheinungen mehr auf.

Für die Hauptversuche habe ich nur einmal gewaschene Plasmodien verwendet, die aber wenigstens $10^{-0,5}$ verdünnt wurden. Bei dieser Verdünnung traten dann auch keine toxischen Todesfälle mehr auf. Da möglicherweise durch mehrmaliges Waschen die Aktivität der Plasmodien gemindert wird, erscheint diese Variation zweckmäßiger.

Im 1. Neutralisationstest (siehe Tab. 5) wurde Serum mit den KBR-Titern von 1:640 und 1:1280 von Mäusen, die mit lebenden Plasmodium berghei infiziert worden waren, und Serum mit dem Titer von 1:160 von mit Plasmodium berghei-Extrakt und Freundschem Adjuvans behandelten Tieren mit den Plasmodienverdünnungen $10^{-0,5}$ bis $10^{-1,0}$ inkubiert. Nach der Injektion dieses Serumparasitengemisches starben alle 20 Mäuse an den Folgen einer Parasitämie. 18 Kontrollmäuse, denen ein Normalmäuseserum- bzw. ein 20 %iges Kaninchenserumparasitengemisch injiziert worden war, verendeten ebenfalls alle.

Dieser Versuch zeigt, daß die komplementbindenden Antikörper nicht in der Lage sind, die isolierten Plasmodien zu neutralisieren.

Um das Ergebnis des ersten Neutralisationstestes nachzuprüfen, habe ich einen zweiten Test angesetzt (siehe Tab. 6). Es wurden die Plasmodienverdünnungen $10^{-0,5}$ bis $10^{-2,0}$ mit Serum (Titer 1:320 bzw. 1:160) inkubiert und dieses Gemisch 24 Mäusen injiziert. Dabei bestätigte sich das Ergebnis des ersten Testes. Das Immunserum konnte die isolierten Parasiten nicht neutralisieren.

In den beiden vorausgehenden Neutralisationstesten wurde durch die Inaktivierung des Serums das Komplement zerstört.

Tab. 5 Ergebnisse des 1. Neutralisationstestes

	Plasmodien-verdünnung	Serum, KBR-Titer	Mortalität
	$10^{-0,5}$	Mi * 1:160	4/4
	$10^{-1,0}$		4/4
	$10^{-0,5}$	Mi 1:1280	4/4
	$10^{-0,5}$	Adj.** 1:160	4/4
	$10^{-1,0}$		4/4
Kontrollen	$10^{-0,5}$	Normal-mäuse-serum	4/4
	$10^{-1,0}$		4/4
	10^{-0}	20%iges Kaninchen-serum	2/2
	$10^{-0,5}$		4/4
	$10^{-1,0}$		4/4

* Mi = Serum von Mäusen, die mit Milchdiät ernährt und mit lebendem Plasmodium berghei infiziert worden sind.

** Adj= Serum von mit Plasmodium berghei-Extrakt und Freundschem Adjuvans immunisierten Mäusen

Tab. 6 Ergebnisse des 2. Neutralisationstestes

	Plasmodien-verdünnung	Serum, KBR-Titer	Mortalität
	$10^{-0,5}$	Mi 1:320	4/4
	$10^{-1,0}$		4/4
	$10^{-2,0}$		3/4
	$10^{-0,5}$	Adj 1:160	4/4
	$10^{-1,0}$		4/4
	$10^{-2,0}$		2/4
Kontrollen	$10^{-1,0}$	Normal-mäuse-serum	4/4
	$10^{-2,0}$		3/4
	$10^{-3,0}$		1/4
	$10^{-4,0}$		0/4

Es ist aber bekannt, daß viele Antigen-Antikörperreaktionen an die Anwesenheit von Komplement gebunden sind (GELL und COOMBS 1963). Um seinen Einfluß auf die Einwirkung von Immunserum auf die isolierten Plasmodien zu prüfen, habe ich dem Serumparasitengemisch (Plasmodienverdünnung $10^{-0,5}$ bis $10^{-3,0}$, KBR-Titer des Serums 1:160) aktives Meerschweinchenserum in der Verdünnung 1:10 hinzugefügt. In den Kontrollgruppen (Plasmodienverdünnung $10^{-1,0}$ bis $10^{-4,0}$) wurde Normalmäuseserum mit Komplement bzw. 20%igem Kaninchenserum gemischt. Nach erfolgter Inkubation und Infektion starben Kontrollmäuse und behandelte Tiere bis zu der Parasitenverdünnung $10^{-1,0}$ bzw. $10^{-2,0}$ (Tab. 7). Wie auch in den beiden vorhergehenden Testen konnte auch in diesem Versuch keine Neutralisation der isolierten Plasmodien beobachtet werden. Die neutralisierende Wirkung der in der KBR positiv reagierenden Seren wird also nicht vom Komplement beeinflußt.

IV. Besprechung der Ergebnisse

Wenn ein Tier mit Bakterien oder Viren infiziert wird, so kommt es zum Auftreten serologisch nachweisbarer Antikörper. Gleichzeitig tritt eine Immunität auf, die in den meisten Fällen zu einer Inaktivierung der Mikroorganismen im Makroorganismus und damit zu einer Überwindung der Infektion führt. Tiere, die eine solche Infektion überstanden haben, sind gegen Reinfektionen immun.

Protozoeninfektionen unterscheiden sich von Infektionen mit Bakterien und Viren dadurch, daß häufig die Erreger nach Überwindung der Krankheit im Organismus persistieren. SERGENT (1954/1 u. 2), RAMAKRISHNAN und Mitarb. (1951), BALDI (1952), LAPIERRE (1954) und FERNANDEZ NAFRIA (1958) nahmen an, daß bei Plasmodium berghei-Infektionen die Immunität an das Vorhandensein der Erreger im Tierkörper gebunden ist. CORRADETTI (1952), CORRADETTI und VEROLINI (1957) und KRETSCHMAR (1962) haben aber behauptet, daß es

Tab. 7 Ergebnisse des 3. Neutralisationstestes

	Plasmodien-verdünnung	Serum, KBR-Titer	Mortalität
	$10^{-0,5}$	Mi 1:160 + Komplement	4/4
	$10^{-1,0}$		4/4
	$10^{-2,0}$		0/4
	$10^{-3,0}$		0/4
Kontrollen	$10^{-1,0}$	Normalmäuseserum + Komplement	4/4
	$10^{-2,0}$		1/4
	$10^{-3,0}$		0/4
	$10^{-4,0}$		0/4
	$10^{-1,0}$	Normalmäuseserum + 20%iges Kaninchenserum	4/4
	$10^{-2,0}$		1/3
	$10^{-3,0}$		0/4
	$10^{-4,0}$		0/4

bei Plasmodium berghei-Infektionen zu einer sterilen Immunität kommt, d.h., auch nach dem Verschwinden der Parasiten aus dem Organismus ist dieser noch gegen Reinfektionen geschützt.

In meinen Versuchen wurden Mäuse mit Plasmodium berghei infiziert, und der sonst regelmäßig und schnell eintretende tödliche Verlauf der Infektion wurde durch eine Milchfütterung hinausgeschoben. Die Tiere hatten also Zeit, eine Immunität zu entwickeln. Stichproben ergaben, daß von den Mäusen tatsächlich serologisch nachweisbare Antikörper gebildet wurden. Die Todesfälle hörten aber trotzdem nicht auf.

Im ersten Versuch wurde eine sehr hohe Infektionsdosis verwendet, deshalb habe ich sie in den zwei weiteren Versuchen verringert. KRETSCHMAR (1962) nimmt zwar an, daß die Dosis keinen Einfluß auf den Ablauf der Infektion hat; SCHINDLER und MEHLITZ (1965/2) haben aber festgestellt, daß Mäuse wohl nach Infektion mit minimalen Infektionsdosen verenden, die Überlebenszeit der Tiere aber mit fallender Dosis zunimmt. Daraus kann man schließen, daß die Menge der injizierten Parasiten einen Einfluß auf den Infektionsablauf hat.

In meinem zweiten und dritten Versuch habe ich die Infektionsdosis um eine bzw. zwei Zehnerpotenzen vermindert. Die Milchfütterung wurde auch nicht im Gegensatz zum ersten Versuch unterbrochen, sondern 38 bzw. 54 Tage ununterbrochen durchgeführt. Außerdem habe ich die Zahl der Blutentnahmen im zweiten Versuch vermindert und im dritten ganz unterlassen. KRETSCHMAR (1962) hat nämlich darüber berichtet, daß jede Beunruhigung der Tiere eine Stresswirkung darstellt, die zu einer Steigerung der Mortalität führt.

Alle diese Änderungen der Versuchsanordnung haben nicht zu einer Verminderung der Mortalität geführt. Die Mehrzahl der Mäuse war in diesen Versuchen also nicht in der Lage,

eine Immunität zu entwickeln, obwohl serologisch nachweisbare Antikörper bei ihnen nachgewiesen werden konnten.

Der Ausgang der Versuche steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von SCHINDLER und MEHLITZ (1965/1). In diesen Versuchen wurden 73 Mäuse mit Milch gefüttert und mit Plasmodium berghei infiziert. 45 Tiere (61,6%) überlebten die Infektion lange Zeit. Andere Autoren haben ebenfalls beobachtet, daß eine Milchfütterung eine unterschiedliche Wirkung auf mit Plasmodium berghei infizierte Mäuse hat. Während MAEGRAITH und Mitarb. (1962), HAWKING (1953) MACKERRAS (1953), RAFFAELE und CARRESCIA (1954) und JACOBI und KRETSCHMAR (1962) eine hohe Überlebensrate beobachteten, haben SCHNEIDER und MONTEZIN (1953), CORRADETTI und Mitarb. (1954/1955) und DURAND und MATHIS (1955) eine starke Sterblichkeit während der Milchfütterung festgestellt. Als Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse wurden die Stärke der Infektion, die Zusammensetzung der Milch, ihr unterschiedlicher Gehalt an p-Aminobenzoe- und Folsäure und die natürliche Resistenz der Tiere verantwortlich gemacht. Auf Grund meiner Beobachtungen hat die Dosis keinen Einfluß auf die Mortalität der Mäuse. Es besteht aber die Möglichkeit, daß eine Interferenz zwischen Plasmodium berghei und Eperythrozoon coccoides bei der variierenden Mortalität eine Rolle gespielt hat. Nach PETERS (1965) wird durch diese Interferenz die Plasmodieninfektion abgeschwächt. Im Versuch von SCHINDLER und MEHLITZ (1965/1) wurde ein mit Eperythrozoon coccoides verunreinigter Plasmodium berghei-Stamm verwendet, in meinen Versuchen benutzte ich einen gereinigten Stamm. Die niedrige Mortalität könnte also in den Versuchen von SCHINDLER und MEHLITZ (1965/1) auf ein Zusammenwirken von Resistenzsteigerung der Mäuse durch eine Milchfütterung und auf eine Interferenz zwischen Plasmodium berghei und Eperythrozoon zurückzuführen sein.

Die geringe Anzahl von Mäusen, die in meinen Versuchen überlebt hat, besaß sehr hohe Antikörpertiter, und es ist sehr wahrscheinlich, daß sie auch immun waren. Ich habe die

Seren dieser Tiere auf neutralisierende Eigenschaften untersucht. Bevor ich das Ergebnis dieser Untersuchungen erörtere, möchte ich die Versuche zur Immunisierung mit Extrakten aus Plasmodium berghei besprechen.

Nach einer Plasmodium berghei-Infektion entwickeln sich bei Mäusen unter dem Einfluß einer Milchdiät serologisch nachweisbare Antikörper; die Mehrzahl der Tiere entwickeln aber gleichzeitig keine Immunität. Durch Injektion von Extrakten aus Plasmodium berghei und Freundschem Adjuvans habe ich versucht, die Antikörperreaktion bei Mäusen anzuregen und auf diese Weise eine Immunität gegenüber Infektionen mit lebenden Plasmodien zu bilden. Dabei machte ich die Beobachtung, daß nach zweimaliger Injektion von jeweils 0,05 ml KBR-Antigen und Freundschem Adjuvans die Antikörperbildung gering war (Titer 1:10 bis 1:20). Erst nach neunmaliger Injektion von 0,2 bis 0,05 ml Antigen und Adjuvans schwankten die Titer der serologisch nachweisbaren Antikörper am 36. Tage nach Beginn der Immunisierung zwischen 1:40 und 1:640.

Die folgende Infektion dieser Tiere zeigte, daß sie nicht geschützt sind, selbst dann nicht, wenn die Titer 1:640 betragen. Eine Immunität hat sich bei den mit KBR-Antigen und Adjuvans behandelten Tieren nicht ausgebildet. Die Milchfütterung während der Immunisierung hatte weder einen Einfluß auf die Antikörperproduktion noch auf die Bildung einer Immunität.

Im Gegensatz zu mir ist es FREUND und Mitarb. (1945, 1948) und THOMSON und Mitarb. (1947) gelungen, mit Plasmodium knowlesi-, Plasmodium lophurae- und Plasmodium cathemerium-Extrakten und Freundschem Adjuvans bei Affen und Enten eine Immunität zu erzeugen. Eine Abhängigkeit der Immunität von der Höhe des Serumtiters wurde aber auch in diesen Fällen nicht festgestellt.

Den negativen Ausfall meiner Immunisierungsversuche mit

Plasmodienextrakten erkläre ich damit, daß das zur Injektion gelangte Antigen zwar die Bildung von komplementbindenden, nicht aber die von schützenden Antikörpern anregen kann. Auch POWELL und BREWER (1964) meinen, daß die bisher in serologischen Testen verwendeten Antigene nicht mit denen identisch sind, die eine Immunität auslösen.

Um die Bedeutung der in meinen Versuchen gebildeten Antikörper für die Immunität weiter zu untersuchen, habe ich die Immunseren in Neutralisationstesten untersucht. Dabei wurden die Seren von infizierten und mit Plasmodium berghei-Extrakt und Freundschem Adjuvans behandelten Tieren geprüft. 1964 hatten KREIER und RISTIC bei der Plasmodium berghei-Infektion mit Hilfe des indirekten Coonstestes einen Antigen-Antikörper-Komplex in vivo nachgewiesen. Das beweist, daß Antikörper die Erythrozytenmembranen durchdringen können. Ich habe aber trotzdem die Parasiten vor den Neutralisationsversuchen aus den Erythrozyten isoliert, um sie der Einwirkung der Antikörper ungehindert auszusetzen.

Die Versuche zeigen, daß das Immunserum nicht in der Lage ist, die isolierten Plasmodien zu neutralisieren. Serum von Tieren, die drei schwere Infektionen mit Plasmodium berghei überstanden haben oder die durch Antigeninjektionen mit Freundschem Adjuvans behandelt worden waren, enthalten also keine neutralisierenden Antikörper, obwohl komplementbindende in hoher Konzentration vorhanden sind.

Der Grund für den negativen Ausfall der Neutralisationsversuche könnte eine Antikörperresistenz des in meinen Versuchen verwendeten Plasmodium berghei-Stammes sein. 1957 machte SOLTYS die Feststellung, daß Trypanosoma brucei nach langen Passagen durch Kaninchen antikörperresistent werden. Passierte er die Trypanosomen jedoch über kurze Zeiträume durch Mäuse, so trat diese Erscheinung nicht auf. Der von mir benutzte Plasmodium berghei-Stamm wurde durch Mäuse im Abstand von 6 bis 7 Tagen passiert. Da erst 8 Tage p.i. frühestens Antikörper nachzuweisen sind (SCHINDLER und

MEHLITZ 1965/1), führe ich den negativen Ausgang der Neutralisationsteste nicht auf eine Antikörperresistenz der Plasmodien zurück. Die Ursache dürfte vielmehr auf fehlenden neutralisierenden Eigenschaften der Antikörper beruhen.

OGILVIE (1964) und ROSE (1961) haben ebenfalls das Fehlen eines Zusammenhanges zwischen serologisch nachweisbaren Antikörpern und Immunität festgestellt. OGILVIE (1964) immunisierte Ratten mit Nippostrongylus brasiliensis und Freundschem Adjuvans. Es bildeten sich präzipitierende Antikörper, die bei der Agar-Gel-Präzipitation nicht von den bei infizierten Ratten gefundenen Antikörpern unterschieden werden konnten. Die vaccinierten Ratten waren weder immun, noch produzierten sie Reagine [(zellgebundene, antikörperähnliche Faktoren (WHO TECHN.REP.SER. 1964)] , wie man sie nach einer Infektion mit lebenden Parasiten findet. Es wäre denkbar, daß diese Reagine, die man mit gewöhnlichen serologischen Testen nicht erfassen kann, auch bei der Plasmodium berghei-Infektion eine wichtige Rolle spielen.

V. Zusammenfassung

382 NMRI-Mäuse wurden über verschieden lange Zeiträume ausschließlich mit Milch ernährt und mit unterschiedlichen Dosen von Plasmodium berghei infiziert bzw. reinfiziert. Bei diesen Tieren ließen sich komplementbindende Antikörper in hohen Konzentrationen feststellen. Trotz des Vorhandenseins dieser serologisch nachweisbaren Antikörper starb die Mehrzahl der Mäuse an den Folgen der Infektion. Eine Immunität hat sich bei den meisten Tieren nicht ausgebildet.

Nach Injektion von Extrakten aus Plasmodium berghei und Freundschem Adjuvans traten bei Mäusen komplementbindende Antikörper auf. Gegen eine nachfolgende Infektion mit lebendem Plasmodium berghei waren die Tiere nicht geschützt, auch wenn die Titer die gleiche Höhe hatten (1:640) wie nach einer Immunisierung mit lebenden Erregern.

Seren von infizierten und mit Plasmodienextrakten behandelten Mäusen waren nicht in der Lage, isolierte Plasmodien in vitro zu neutralisieren.

Diese Befunde zeigen, daß bei der Plasmodium berghei-Infektion der Maus KBR-Antikörper auftreten können, ohne daß gleichzeitig eine Immunität ausgebildet wird. Das gleiche gilt für Mäuse, die mit Extrakten aus Plasmodium berghei und Freundschem Adjuvans behandelt worden sind.

VI. Literaturverzeichnis

1. BALDI, A.: Sull'infezione da Plasmodium berghei (Vincke e Lips). Riv. Malar. 31 (1952), 41

2. BASS, C.C., F.M. JOHNS: Cultivation of malaria plasmodia (Plasmodium falciparum) in vitro in the blood of a diabetic without the addition of dextrose. Amer. J. trop. Med. 1 (1913), 246

3. DE BLASI, D.: Sulla deviazione del complemento nella malaria umana. Ann. Igiene Sper. N.S. 17 (1907), 677

4. BOX, E.D., E.D. GINGRICH: Acquired immunity to Plasmodium berghei in white mouse. J. inf. Dis. 103 (1958) 291

5. BOYD, M.F., S.F. KITCHEN: Is the acquired homologous immunity to P. vivax equally effective against sporozoites and trophozoites? Amer. J. trop. Med. 16 (1936), 317

6. BOYD, M.F., S.F. KITCHEN: On attempts to hyperimmunize convalescents from vivax malaria. Amer. J. trop. Med. 23 (1943), 209

7. BOYD, M.F., W.K. STRATMAN-THOMAS, S.F.KITCHEN: On acquired immunity to Plasmodium falciparum. Amer. J. trop. Med. 16 (1936), 139

8. BRAY, R.S.: The Stein and Desowitz haemagglutination test for the detection of antibodies to Plasmodium berghei and Plasmodium vinckei. Colloquium über das Plasmodium berghei Vincke u. Lips Antwerpen 1964

9. BRIGGS, N.T., B.L. GARZA, E.D. BOX: Alterations of serum proteins in mice acutely and chronically infected with Plasmodium berghei. Exp. Parasit. 10 (1960), 21

10. BROOKE, M.M., G.H. HEALY, D.M.MELVIN: Staining Plasmodium berghei with fluorescinlabelled Antibodies. VI. Int. Conf. Trop. Med. and Malar. 7 (1959), 59

11. BRUCE-CHWATT, L.J., F.D.GIBSON: Transplacental passage of Plasmodium berghei and passive transfer of immunity in rats and mice. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg. 50 (1956), 47

12. CAUSSE-VAILLES,C., M.ORFILA, G.FABIANI: Fractionnement électrophoretique des proteines et pouvoir protecteur du sérum du rat blanc immunisé contre Plasmodium berghei. Ann. Inst Pasteur 100 (1961), 232

13. COGGESHALL, L.T.: The occurence of malaria antibodies in human serum following induced infection with Plasmodium knowlesi. J. exp. Med. 72 (1940), 21

14. COGGESHALL,L.T., M.D. EATON: The complement fixation reaction in monkey malaria. J. exp. Med. 67 (1938), 871

15. COGGESHALL, L.T., H.W. KUMM: Demonstration of passive immunity in experimental monkey malaria. J. exp. Med. 66 (1937), 177

16. COGGESHALL, L.T., H.W. KUMM: Effect of repeated superinfection upon the potency of immune serum of monkeys harboring chronic infections of Plasmodium knowlesi. J. exp. Med. 68 (1938), 17

17. COHEN, S., I.A. MAC GREGOR, S. CARRINGTON: Gamma globulin and acquired immunity to human malaria. Nature 192 (1961), 733

18. COLLINIS, W.E., G.M. JEFFERY, J.C. SKINNER: Fluorescent antibody studies in huma malaria. I. Development of antibodie to Plasmodium malaria. Amer. J. trop Med. Hyg. 13 (1964/1), 1

19. COLLINIS, W.E., G.M. JEFFERY, J.C. SKINNER: Fluorescent antibody studies in huma malarias. II. Development and persis tance of antibodies to Plasmodium falciparum. Amer. J. trop. Med. Hyg. 13 (1964/2), 256

20. CORRADETTI, A.: Particolari fenomeni immunitari nell fezione da Plasmodium berghei. Riv. Parassit. 11 (1950), 201

21. CORRADETTI, A.: Etudes de pathologie et d'immunologi comparées dans le paludisme de l' homme et des animaux. Riv. Malar. 31 (1952), 129

22. CORRADETTI, A.: Relapses and immunological course in Plasmodium infections. Parassitologi 1 (1959), 95

23. CORRADETTI, A., L. TENTORI, F. VEROLINI: Osservazione sull'infezione da Plasmodium berghei in ratti tenuti a dieta lattea. Riv. Parassit. 15 (1954), 21

4. CORRADETTI, A., L. TENROTI, F. VEROLINI: Osservazione sull'infezione da Plasmodium berghei in ratti tenuti a dieta lattea, R.C. Ist. sup. Sanità 18 (1955), 256

5. CORRADETTI, A., F. VEROLINI: Dimostrazione che l'immunità acquisita del ratto albino al Plasmodium berghei è una immunità assoluta. Riv. Parassit. 18 (1957), 65

6. DESOWITZ, R.S., B. STEIN: A tanned red cell haemagglutination test, using Plasmodium berghei antigen and homologous antisera. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg. 56 (1962), 257

7. DULANEY, A.D., V. HOUSE: Precipitative tests in malaria. Proc. Soc. exp. Biol. 48 (1941), 620

8. DULANEY, A.D., D.B. MORRISON: On the preparation and properties of antigens from Plasmodium knowlesi. Amer. J. trop. Med. 24 (1944), 620

9. DULANEY, A.D., W.K. STRATMAN-THOMAS, O.S. WARR: The diagnostic value of complement fixation in malaria. J. inf. Dis. 70 (1942), 221

0. DULANEY, A.D., R.B. WATSON: Complement fixation in relapsing Plasmodium vivax malaria. Amer. J. trop. Med. 25 (1945), 473

1. DURAND, P., M. MATHIS: Evolution normale de l'infection à Plasmodium berghei chez la souris soumise au régime lacté. Arch. Inst. Pasteur Tunis. 32 (1955), 313

2. EATON, M.D.: The agglutination of Plasmodium knowlesi by immune serum. J. exp. Med. 67 (1938), 857

3. EATON, M.D., L.D. COGGESHALL: Immune response of Plasmodium knowlesi. J. exp. Med. 70 (1939), 131

4. EDOZIEN, J.C., H.M. GILLES, I.O.K. UDEOZO: Adult and cordblood gamma-globulin and immunity to malaria in Nigerians. Lancet 10 (1962), 951

5. FABIANI, G., G. FULCHIRON: Comportement des hématozoaires des réinoculation dans la cavité peritonéale des rats guéris d'infection à Plasmodium berghei. Mise en évidence de la phagozytose des parasites. C.R. Soc. Biol. (Paris) 147 (1953), 103

36. FABIANI, G., J. ORFILA: Recherche du pouvoir séro-protecteur chez le rat infecté expérimentalemen par Plasmodium berghei. C.R. Soc. Biol. (Paris), 150 (1956), 1182

37. FABIANI, G., R. VARGUES: Comportement des hématozoaires des réinoculations dans le sang du rat guéri d'infection à Plasmodium bergh C.R. Acad. Sci. 233 (1951), 502

38. FABIANAI, G., R. VARGUES, P. GRELLET, G.FULCHIRON, A. VERAIN: Le paludisme expérimentale du rat blanc à Plasmodium berghei. Bull. Soc. Path. exot. 45 (1952), 524

39. FERNANDEZ NAFRIA,A.: El paludismo experimental por Plasmo dium berghei. Med. trop. (Madr.) 31 (1958), 16

40. FERRANNINI, L.: La formazione di anticorpi specifici e la fissazione del complemento nell malaria. Rif.med. 7 (1911), 177

41. FREUND, J., H.E. SOMMER, A.W. WALTER: Immunization against malaria: Vaccination of ducks with killed parasites incorporated with adjuvant Science 102 (1945), 200

42. FREUND, J., K.J. THOMSON, H.E. SOMMER, A.W. WALTER, T.M. PISANI: Immunization of monkeys against malaria by means of killed parasites with adjuvans. Amer. J. trop. Med. 28 (1948), 1

43. FULTON, J.D., T.H. FLEWETT: The relation of Plasmodium berghei and Plasmodium knowlesi to their respective redcell host. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg. 50 (1956), 150

44. GARNHAM, P.C., A.E. PIERCE, I. ROITT: Immunity to protozoa. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1963

45. GARZA, B.L., E.D. BOX: Evaluation of test of cure procedure in mice treated for Plasmodium bergh infections. Amer. J. trop. Med. Hyg. 10 (1961), 804

46. GASBARRINI, A.: Das Bordet-Gengousche Phaenomen (Komplementablenkung) bei Malaria. Z. Immun.-Forsch. 20 (1914), 178

47. GELL, P.G.H., R.R.A. COOMBS: Clinical aspects of immunology. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1963

48. HAWKING, F.: Milk diet, p-aminobenzoic acid, and malaria (Plasmodium berghei). Preliminary communications. Brit. med. J. 1 (1953), 1201

49. HEIDELBERGER, M., M.M. MAYER, C.R. DEMAREST: Studies in human malaria. I. The preparation of antigens and suspensions containing Plasmodia. J. Immunol. 52 (1946/1), 325

50. HEIDELBERGER, M., W.A. COATES, M.M. MAYER: Studies in human malaria II. Attempts to influence relapsing vivax malaria by treatment of patients. J. Immunol. 53 (1946/2),101

51. HEIDELBERGER, M., C. PROUT, J.A. HINDLE, A.S. ROSE: Studies in human malaria. III. An attempt at vaccination of paretics against blood-borne infections with Plasmodium vivax. J. Immunol. 53 (1946/3), 109

52. HEIDELBERGER, M., M.M.MAYER, A.S. ALVING, B.J. GRAICE, R.J. JONES, T.M. PAULLMAN, M.WHORTON: Studies in human malaria. IV. An attempt at vaccination of volunteers against mosquito borne infections with Plasmodium vivax. J. Immunol. 53 (1946/4), 113

53. INGRAM, R.L., L.B. OTKEN, J.R. JUMPER: Staining of malaria parasites by the fluorescent antibody technic. Proc. Soc. exp. Biol. 106 (1961), 52

54. JACKSON, G.J.: Fluorescent antibody studies on Nippostrongylus muris infections. J. inf. Dis. 106 (1960), 20

55. JACOBI, K., W. KRETSCHMAR: Die Milchtherapie der Malariainfektion (Plasmodium berghei) bei der Maus. Z. Tropenmed. Parasit. 13 (1962), 286

56. KAUDERS, O.: Immunitätsstudien bei der Impfmalaria. Zbl. Bakt. 104 (1927), 158

57. KINGSBURY, A.N.: Some investigations of malaria fevers. IV. The complement fixation reaction. Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg. 20 (1927), 359

58. KLIGLER, I.J., M. YOELI: Diagnostic and epidemiologic significance of complement fixation test in human malaria. Amer. J. trop. Med. 21 (1941), 531

59. KREIER, J.P., M. RISTIC: Detection of Plasmodium berghei-antibody complex formed in vivo. Amer. J. trop. Med. Hyg. 13 (1964), 8

60. KRETSCHMAR, W.: Resistenz und Immunität bei mit Plasmodium berghei infizierten Mäusen. Z. Tropenmed. Parasit. 13 (1962), 159

61. KRETSCHMAR, W.: Weitere Untersuchungen über die Immunität bei der Nagetiermalaria. Z. Tropenmed. Parasit. 14 (1963), 41

62. KUVIN, S.F., J.E. TOBIE, C.B. EVANS, G.R. COATNEY, P.G. CONTACOS: Antibody production in human malaria as determined by the fluorescent antibody technic. Science 135 (1962/1), 1130

63. KUVIN, S.F., J.E. TOBIE, C.B. EVANS, G.R. COATNEY, P.G. CONTACOS: Fluorescent antibody studies on the course of antibody production and serum gamma globulin in normal volunteers infected with human and simian malaria. Amer. J. trop. Med. Hyg. 11 (1962/2), 429

64. LAPIERRE, J.: Plasmodium berghei chez la souris. Apparition d'un état d'immunité à la suite de traitement repetés par la Nivaquin au cours des rechutes. Bull. Soc. Path. exot. 47 (1954), 380

65. LIPPINCOTT, S.W., H.H. GORDON, W.B. HESSELBROCK, A. MARBLE: Complement fixation in human malaria using an antigen prepared from the chicken parasite Plasmodium gallinaceum. J. clin. Invest. 24 (1945), 362

66. LORENZ, R.J.: Schnellmethoden zur LD_{50}-Schätzung, Biometrisches Seminar für Virologen vom 26.-30.Oktober 1964; Vortragsmanuskripte. Herausgeber: Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen 1964

67. MACDONALD, G.: The epidemiology and control of malaria. Oxford, London, 1957

68. MACKERRAS, M.J.: Suppression of Plasmodium berghei in rats on a milk diet. Aust. J. biol. Sci. 16 (1953),24

69. MAEGRAITH, B.C., T. DEEGAN, E.S. JONES: Suppression of malaria (Plasmodium berghei) by milk. Brit. med. J. 11 (1952), 1382

70. MAYER, M.M., M. HEIDELBERGER: Studies in human malaria. V. Complement fixation reactions. J. Immunol. 54 (1946), 89

71. MULLIGAN, H.W., P.F. RUSSEL, B.N. MOHAN: Specific agglutination of sporozoites. J. Malar. Inst. India. 3 (1940), 513

72. MULLIGAN, H.W., P.F. RUSSEL, B.N. MOHAN: Active Immunization of fowls against Plasmodium gallinaceum by injection of killed homologous sporozoites. J. Malar. Inst. India 4 (1941), 25

73. NAUCK, E.G.: Immunitätsprobleme bei Malaria. Z. Tropenmed. Parasit. 4 (1953), 285

74. NEUMANN, H.: Über die Antikörper und die Immunität bei der menschlichen Malaria. Arch. Schiffs- u. Tropenhyg. 37 (1933), 427

75. NIYOGI, A.K.: Complement fixation of human serum in Plasmodium vivax infections with Plasmodium knowlesi antigen. Ann. Bioch. 2 (1942), 51

76. OGILVIE, B.M.: Reagine-like antibodies in animals immune to helminth parasites. Nature 204 (1964), 91

77. PAUTRIZEL, R., NGUYEN-VINH-NIEN: Mise en évidence d'anticorps chez le rat parasité par Plasmodium berghei, à l'aide d'un antigène préparé avec du sang de rat impaludé: Bull. Soc. Path. exot. 46 (1953), 671

78. PETERS, W.: Competive relationship between Eperythrozoon coccoides and Plasmodium berghei. Exp. Parasit. 16 (1965), 158

79. PEWNY, W.: Präzipitationsversuche bei Malaria. Wien. Klin. Wschr. 31 (1918), 205

80. POWELL, R.D., G.J. BREWER: Active immunization against malaria. Amer. J. trop. Med. Hyg. 13 (1964), 228

81. RAFFAELE, G., A. BALDI: Sulla morfologia et sulla trasmissione di Plasmodium berghei (Vincke e Lips). Riv. Malar. 29 (1950), 341

82. RAFFAELE, G., M. CARRESCIA: Sull'azione della dieta lattea nelle infezioni da Plasmodium berghei dei topi e sua influenza sull'immuntà. Riv. Malar. 33 (1954), 47

83. RAMAKRISHNAN, S.P., L.J.BRUCE-CHWATT, S. PRAKASH, D.S. CHOWDHURY, S. PATTANAYAK, DALIP SINGH, S.K. DHAR: Selection of a strain of albino mice refractory to Plasmodium berghei-infektion. Bull. WHO. 31 (1965), 393

84. RAMAKRISHNAN, S.P., P. SATYA PRAKASH, KRISNASWANI: Studies on Plasmodium berghei, Vincke a. Lips, 1948. III. Latency relapse and immunity in albinorats with blood-induced infections. Indian J. Malar. 5 (1951), 447

85. REIN, C.R., S.C. BUKANTS, J.F. KENT, W.C. COOPER, D.S. RUHE, G.R.COATNEY: Studies in human malaria. XIX. The course of complement-fixation reacti in sporozoite induced St.Elisabeth strain vivax malaria. Amer. J. Hyg. 49 (1949), 374

86. ROSE, M.E.: The complement-fixation test in hepatic coccidiosis of rabbits. Immunology 4 (1961), 346

87. ROW, R.: Precipitin reaction in malaria sera. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg. 24 (1931), 623

88. RUSSEL, P.F., B.N. MOHAN: The immunization of fowls against mosquito-borne Plasmodium gallinaceu by injections of serum and of inacti vated homologous sporozoites. J. exp Med. 76 (1942). 477

89. RUSSEL, P.F., H.W. MULLIGAN, B.N. MOHAN: Specific agglutinogenic properties of inactivated sporozoites of Plas- modium gallinaceum. J. Malar. Inst. India. 4 (1941), 15

90. RUSSEL, P.F., H.W. MULLIGAN, B.N. MOHAN: Active immunization of fowls against sporozoites but not trophozoites of Plasmodium gallinaceum by injection of homologous sporozoites. J. Malar. Inst. India. 4 (1942), 311

91. SCHILLING, C.: Schutzimpfung gegen Malaria. Dtsch. med. Wschr. 65 (1939), 1264

92. SCHILLING, C.: Nachweis von Antikörpern im Blute Malariakranker. Z. Immun.-Forsch. 104 (1943), 212

93. SCHINDLER, R., D. MEHLITZ: Untersuchungen über die Bedeutung komplementbindender Antikörper für die Plasmodium berghei-Infektion der Maus. Z. Tropenmed. Parasit. 16 (1965/1), 30

94. SCHINDLER, R., D. MEHLITZ: Untersuchungen über den Einfluss der Infektionsdosis auf die Überlebens- zeit bei der Plasmodium berghei- Infektion der Maus. Z. Tropenmed. Parasit. 16 (1965/2), 49

95. SCHNEIDER, J., G. MONTEZIN: Plasmodium berghei et lait; absence d'action du régime lacté chez la souris. Bull. Soc. Path. ext. 46 (1953), 947

96. SERGENT, E.: Observations d'infection latente d'imblée avec prémunition corrélative, dans le paludisme expérimentale à Plasmodium berghei. C.R. Acad. Sci. 239 (1954/1), 524

97. SERGENT, E.: Experimental study on the immunology of malaria due to Plasmodium berghei. Indian. J. Malar. 8 (1954/2), 333

98. SERGENT, E., E. SERGENT: Sur l'immunité dans le paludisme des oiseaux. Conservation in vitro des sporozoites de Plasmodium relictum. Immunité relative obtenué par inoculation de ces sporozoites. C. R. Acad. Sci. 151 (1910), 407

99. SERGUIEV, P.G., N.A. DEMINA: Studies of immunity to Plasmodium berghei infection. I. The transmission of acquired immunity against Plasmodium berghei from female to their offsprings. Indian J. Malar. 11 (1957), 129

100. SHORTT, H.E., K.P. MENON: Attempt to produce active immunity to malaria in monkeys by vaccination with parasites substances. J. Malar. Inst. India. 3 (1940), 191

101. SINTON, J.A.: Studies in immunity in Malaria. IV. The effect of drugs upon the development of immunity and its relationship to the principles of treatment. J. Malar. Inst. India. 2 (1939), 191

102. SINTON, J.A.: Studies in infections with Plasmodium ovale. IV. The efficacy and nature of the immunity acquired as a result of infections induced by sporozoite inoculations as compared with those by throphozoite infections. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg. 33 (1940), 439

103. SOLTYS, M.A.: Immunity in trypanosomiasis, Neutralization reaction. Parasitology 47 (1957), 375

104. SORIRIADES, D.: Greece Med. 19 (1917), 27 zit. nach Mac Gregor: Amer. J. trop. Med. Hyg. 13 (1964), 237

105. STEIN, B., R.S. DESOWITZ: The measurement of antibody in human malaria infections by a formolized tanned sheep cell haemagglutination test. Bull. WHO, 30 (1964), 45

106. TALIAFERRO, W.H.: Immunity to the malaria infections. In Malariology, ed. by M.F. Boyd, Vol. II (1949), 935, W.B. Saunders Co., Philadelphia

107. TALIAFERRO, W.H., C. KLÜVER: The hematology of malaria (Plasmodium brasilianum) in Panamania monkeys. 1. Numerial changes in leucocytes. J. inf. Dis. 67 (1940), 121

108. TALIAFERRO, W.H., L.G. TALIAFERRO: A precipitin test in malaria (2nd rept.) J. prev. Med. 2 (1928), 147

109. TALIAFERRO, W.H., L.G.TALIAFERRO, A.B. FISHER: A precipitin test in malaria. J. prev. Med. 1 (1927), 343

110. TERRY, R.J.: Transmission of antimalarial immunity (Plasmodium berghei) from mother rats to their young during lactation. Trans. roy. Soc. Med. Hyg. 50 (1956), 41

111. THOMSON, J.G.: The growth and sporulation of benign and malignant tertian malaria parasit in the culture tube and the human hos Proc. roy. Soc. B. 87 (1913), 77

112. THOMSON, J.G.: Preliminary note on the complement deviation in cases of malaria: a new aid to diagnosis. Brit. med. J. 7 (1918), 628

113. THOMSON, J.G.: Experiments on the complement fixatio in malaria with antigens prepared fro cultures of malarial parasites. (Plas modium falciparum and Plasmodium vivax). Proc. roy. Soc. Med. 12 (1919), 39

114. THOMSON, K.J., J. FREUND, H.E. SOMMER, A.W.WALTER: Immunization of ducks against malaria by means of killed parasites with or without adjuvants. Amer. J. trop. Med 27 (1947), 79

115. THOMSON, K.J., H.E. SOMMER, A.W. WALTER, E.L. SCHENKLEIN: Immunization of rhesus monkeys agains malarial infection (Plasmodium know- lesi) with killed parasites and adjuvants. Science 102 (1945), 202

16. TOBIE, J.E.: Detection of malaria antibodies.- Immunodiagnosis. Amer. J. trop. Med. Hyg. 13 (1964), 195

17. TOBIE, J.E., G.R. COATNEY: Fluorescent antibody staining of human malaria parasites. Exp. Parasit. 11 (1961), 128

18. VARGUES, R.: Etude sérologique de l'infection expérimentale du rat blanc par Plasmodium berghei: Disparation de l' alexine (complément). Presence d' anticorps fixant le complément. C. R. Soc. Biol. 145 (1951), 1134

19. VARGUES, R., G. FABIANI: La réinoculation intracardiaque de Plasmodium berghei chez des rats guéris d'une infection. C.R. Soc. Biol. 145 (1951), 1521

20. VARGUES, R., G. FABIANI, G. FULCHIRON: Etude sérologique de l'infection expérimentale du rat blanc par Plasmodium berghei. Variations quantitatives de la sensibilisatrice et de l'alexine au cours de la maladie. C.R. Soc. Biol. 145 (1951), 1298

21. VINCKE, I.H., M.A. VAN DEN BULCKE: Réaction des Rattus-Rattus vis-a-vis du Plasmodium berghei Vincke et Lips. Ann. Soc. belge Méd. trop. 29 (1949), 525

22. VOLLER, A.: Fluorescent antibody studies on malaria parasites. Bull. WHO 27 (1962), 283

23. VOLLER, A.: Comments on the detection of malaria antibodies. Amer. J. trop. Med. Hyg. 13 (1964), 204

24. VOLLER, A., R.S. BRAY: Fluorescent antibody staining as a measure of malaria parasites. Proc. Soc. exp. Biol. N.Y. 110 (1962), 907

25. WHO TECHN. REP. SER. 286 (1964), 71

VII. Lebenslauf

Am 9.11.1937 bin ich als Sohn des Kaufmannes Adolf Mehlitz und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Meyer, in Berlin-Charlottenburg geboren. Ich besuchte die Grundschulen in Berlin-Gross Glienicke und in Wiedelah, Kreis Goslar, und die Oberschulen in Goslar, in Hamburg-Harburg und die Freiherr-vom-Stein Schule in Berlin-Spandau, an der ich am 14.3.1957 die Reifeprüfung bestand.

Mein Studium begann ich in Berlin an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität (SS 1957 bis WS 1958/59, WS 1959/60 und SS 1960) und setzte es dann an der Tierärztlichen Hochschule in Hannover (SS 1959) und an der Tiermedizinischen Fakultät der Universität München fort (WS 1960/61 bis WS 1962/63). Die tierärztliche Vorprüfung bestand ich am 21.3.1960 an der Freien Universität in Berlin und die tierärztliche Prüfung am 15.3.1963 an der Universität in München.

Nach einem halbjährigen Praktikum bei dem Lehrtierarzt Dr. Fritz Schlaak in Treia, Kreis Schleswig, erhielt ich am 6.11.1963 die Bestallung als Tierarzt.

Seit dem 1.12.1963 arbeite ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung für Veterinärmedizin im Tropeninstitut Hamburg.

Herrn Dr. R. Schindler möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und die Unterstützung und fürsorgliche Betreuung während meiner Arbeit im Tropeninstitut herzlich danken..

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. J. Boch für die Durchsicht und die Ratschläge bei der Fertigstellung der Arbeit.

Schreib - Druck
Chemoprint OHG
Gießen